

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Camila Siqueira Neves

***Pfaffia glomerata* SPRENG. PEDERSEN (GINSENG
BRASILEIRO): CITOGENOTOXIDADE NO ENSAIO DE *Allium*
*cepa L.***

JUIZ DE FORA
2013

CAMILA SIQUEIRA NEVES

***Pfaffia glomerata* SPRENG. PEDERSEN (GINSENG
BRASILEIRO): CITOGENOTOXIDADE NO ENSAIO DE *Allium*
cepa L.**

Dissertação de Mestrado do Curso
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, para obtenção do Título
de Mestre em Ciências Biológicas na
área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Marcello Salabert de Campos.

Juiz de Fora
2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Siqueira Neves, Camila.

Pfaffia glomerata Spreng. Pedersen (Ginseng brasileiro): citogenotoxicidade no ensaio de Allium cepa L. / Camila Siqueira Neves. -- 2013.
99 f. : il.

Orientador: José Marcello Salabert de Campos

Coorientador: Lyderson Facio Viccini

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2013.

1. Allium cepa. 2. alterações cromossômicas. 3. ginseng brasileiro . 4. índice mitótico. 5. Pfaffia glomerata. I. Salabert de Campos, José Marcello, orient. II. Facio Viccini, Lyderson, coorient. III. Título.

Dedicatória

Aos meus pais João Francisco de Assis Neves e Suziengladys da Silva Siqueira, meus maiores exemplos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades e por mais esta etapa concluída.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro para a realização do projeto e participação em eventos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas e à Universidade Federal de Juiz de Fora pela oportunidade de realizar o curso para obtenção do Título de Mestre.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação pelos ensinamentos e inspiração.

Ao Professor Doutor José Marcello Salabert de Campos, primeiramente por me aceitar como sua orientada. Agradeço a oportunidade de fazer parte deste grupo de pesquisa e a confiança. Obrigada pela paciência, pelos inúmeros ensinamentos, por sua dedicação e disponibilidade em ajudar sempre. Obrigada também pelo carinho, pela amizade e pelas boas risadas na cantina e nos corredores.

Ao Professor Doutor Lyderson Facio Viccini por mostrar-se sempre disposto a ajudar.

Ao Professor Doutor Wagner Campos Otoni pela gentileza em fornecer o material vegetal utilizado neste trabalho.

À professora Doutora Nádia Rezende Barbosa Raposo pela ajuda na realização das análises químicas e por colocar seu laboratório sempre à disposição.

À professora Doutora Luciana Moreira Chedier por todas as vezes que esclareceu minhas dúvidas de Química e pela boa vontade que sempre demonstrou em colaborar com a realização deste projeto.

Ao Professor Doutor Carlos Magno da Costa Maranduba pelos bons conselhos e conversas.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação pelos bons momentos compartilhados nas aulas, seminários, corredores e laboratórios.

A todos os colegas do Laboratório de Genética pelo convívio diário, pelas brincadeiras, pelos ensinamentos e pela acolhida no início do Mestrado.

Aos alunos de Iniciação Científica pelo convívio diário e pela colaboração nos experimentos, principalmente ao Francisco Carlos da Guia, farmacêutico quase biólogo, por estar sempre disposto a compartilhar seus conhecimentos químicos e matemáticos.

Meu agradecimento especial à querida amiga Shaiany Sabrina Lopes Gomes por tudo que me ensinou, pela acolhida quando cheguei ao laboratório e pela amizade construída dia após dia. Obrigada pela sua presença em todos os momentos acadêmicos, pelos conselhos intelectuais e pessoais, pela companhia em todos os momentos e pelo carinho!

Aos meus amados pais João e Suzy por todos os sacrifícios em função da realização dos meus projetos pessoais e profissionais. Pelos conselhos, pelo amor incondicional, pelo apoio, confiança e amizade. Vocês são os melhores exemplos que alguém poderia ter!

À minha querida avó Iracy da Silva Siqueira (*in memmorian*) pelo incentivo quando decidi fazer faculdade longe de casa, pelo exemplo de força e perseverança e por me ensinar que é preciso lutar até o fim. Saudades sempre!

Ao Cigano pelo apoio, pela torcida e por estar sempre presente.

Aos avós emprestados Olga e Michel que mesmo de longe torcem pelas minhas conquistas.

Aos amigos de Friburgo e Ouro Preto que mesmo à distância sempre me apoiaram.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

.

.

"Encontre a felicidade no seu trabalho ou talvez nunca saberá o que é
felicidade."

Elbert Hubbard

RESUMO

NEVES, C.S. *Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen (Ginseng brasileiro): citogenotoxicidade no ensaio de *Allium cepa*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

O uso de plantas com fins terapêuticos é uma das práticas mais antigas da humanidade e foi reconhecido pela Organização Mundial de Saúde em 1978. No entanto, sabe-se que o uso indiscriminado de plantas medicinais em doses excessivas pode trazer prejuízos à saúde humana. Os principais efeitos adversos em resposta ao uso de plantas medicinais são a toxidez, diferenças no índice de células em divisão e a indução de alterações cromossômicas. *P. glomerata* é popularmente conhecida como ginseng brasileiro, por apresentar propriedades farmacológicas semelhantes ao ginseng coreano (*Panax ginseng* C. A. Mey). A espécie é geralmente empregada como tônico, afrodisíaco, no tratamento de doenças reumáticas, anti-estresse e anti-diabético. Diversos ensaios biológicos que empregam organismos como bioindicadores estão disponíveis para a avaliação destes efeitos, sendo *Allium cepa* um dos mais empregados. O teste de *A. cepa* foi utilizado no presente trabalho com o objetivo de avaliar os efeitos citogenotóxicos de extratos de *Pfaffia glomerata*. Foram testados dois tipos de extratos de raízes: metanólico e aquoso, em concentrações que variaram de 8 a 256 mg/mL. Ensaio de germinação e crescimento radicular foram realizados pelo período de oito dias e os ensaios de citogenotoxicidade foram feitos nos períodos de 24, 48 e 72h de exposição. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e coradas com Giemsa 5%. Os resultados mostraram inibição da germinação de sementes após exposição ao extrato metanólico e redução do comprimento das raízes, de forma dependente da dose. Foi observada inibição significativa dos índices mitóticos após exposição aos dois extratos, sendo o índice observado para o extrato metanólico ainda menor. Alterações cromossômicas foram observadas em todas as concentrações testadas, com maior frequência de cromossomos

aderentes, formação de pontes em anáfase e telófase e também indução de micronúcleos. Os ensaios com *Allium cepa* mostraram ação tóxica e genotóxica tanto para o extrato aquoso de *P. glomerata* quanto para o extrato metanólico. Estes efeitos são provavelmente devido à presença de saponinas e ecdisteróides (β -ecdisona) nas raízes da espécie. O teste de *Allium cepa* com a substância β -ecdisona também mostrou efeito citogenotóxico. Sugere-se, portanto, o uso racional de raízes de *P. glomerata* com fins terapêuticos e a necessidade de estudos mais aprofundados acerca de seu potencial citogenotóxico.

Palavras-chave: *Allium cepa*, alterações cromossômicas, ginseng brasileiro índice mitótico, *Pfaffia glomerata*.

ABSTRACT

NEVES, C.S. *Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen (Brazilian ginseng): cytogenotoxicity in the *Allium cepa* assay. Dissertation (Master in Biological Sciences) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

The use of plants for therapeutic purposes is one of the oldest practices of mankind, and was recognized by the World Health Organization in 1978. However, it is known that the indiscriminate use of medicinal plants in excessive doses can be harmful to human health. The main adverse effects in response to the use of medicinal plants are the toxicity, differences in the rate of cell division and the induction of chromosomal aberrations. *P. glomerata* is popularly known as "Brazilian Ginseng" due to its pharmacological properties similar to Korean ginseng (*Panax ginseng* C. A. Mey). The species is usually used as tonic, aphrodisiac, in the treatment of rheumatic diseases, anti-stress and anti-diabetic. Several biological assays using organisms as bioindicators are available to assess these effects and *Allium cepa* is the most used. The *A. cepa* test was used in this study, with the aim to evaluate the cytogenotoxic effects of *P. glomerata* extracts using *A. cepa* test model. Two different root extracts were tested: methanolic and aqueous, with concentrations ranging from 8 to 256 mg/mL. Germination and root growth assays were performed for eight days and the cytogenotoxic tests were performed during 24, 48 and 72 hours of exposure. Slides were prepared by the squash technique and stained with 5% Giemsa. The results showed inhibition of germination after exposure to methanolic extract and reduction of root length in a dose-dependent manner. Significant inhibition of mitotic index was observed after exposure to the two extracts, being the index for the methanolic extract even smaller. Chromosomal aberrations were observed at all concentrations tested and the most frequent abnormalities were chromosome adherence, bridges in anaphase and telophase and micronuclei. *P. glomerata* roots are rich in saponins and ecdysteroids, being β -ecdysone its major component. The *A. cepa* model showed toxic and genotoxic effects for both extracts tested. These effects are probably due to the presence of saponins and ecdysteroids (β -ecdysone) in *P. glomerata* roots. The *Allium cepa* test showed that β -ecdysone also showed cytogenotoxic effects. It is suggested, therefore, the rational use of *P. glomerata* roots for therapeutic purposes and the necessity of further studies about its cytogenotoxic potential.

Key-words: *Allium cepa*, chromosomal aberrations, Brazilian ginseng, mitotic index, *Pfaffia glomerata*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química do ecdisteróide β -ecdisona.....	10
Figura 2.	<i>Pfaffia glomerata</i> cultivada em casa de vegetação e raiz de <i>P. glomerata</i>	22
Figura 3.	Cromatogramas obtidos por HPLC para o padrão de β -ecdisona.....	29
Figura 4.	Ensaio de germinação e crescimento radicular em <i>Allium cepa</i> após exposição ao extrato metanólico de <i>P. glomerata</i>	31
Figura 5.	Análise de ciclo celular após exposição ao extrato metanólico de <i>P. glomerata</i>	33
Figura 6.	Percentual de micronúcleos após exposição ao extrato metanólico de <i>P. glomerata</i>	37
Figura 7.	Análise de ciclo celular após exposição às concentrações de β -ecdisona.....	38
Figura 8.	Percentual de micronúcleos após exposição às concentrações de β -ecdisona.....	41
Figura 9.	Análise de ciclo celular após exposição ao extrato aquoso de <i>P. glomerata</i>	42
Figura 10.	Percentual de micronúcleos após exposição ao extrato aquoso de <i>P. glomerata</i>	44
Figura 11.	Fases normais do ciclo celular em <i>Allium cepa</i>	45
Figura 12.	Alterações aneugênicas observadas nas células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	45
Figura 13.	Alterações clastogênicas observadas nas células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	46
Figura 14.	Micronúcleos e buds (brotos) observados nas células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Exemplos de drogas originadas a partir de substâncias isoladas em plantas.....	4
Tabela 2.	Exemplos de espécies vegetais utilizadas no controle de doenças em plantas de <i>Pfaffia glomerata</i>	5
Tabela 3.	Concentrações de β -ecdisona encontradas em cada extrato metanólico.....	30
Tabela 4.	Percentual de alterações cromossômicas após exposição ao extrato metanólico de <i>Pfaffia glomerata</i>	36
Tabela 5.	Percentual de alterações cromossômicas após exposição às concentrações de β -ecdisona.....	40
Tabela 6.	Percentual de alterações cromossômicas após exposição ao extrato aquoso de <i>P. glomerata</i>	43

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Alterações cromossômicas
ANOVA	Análise de Variância
β	Beta
CAS	Chemical Abstracts Service
cm	Centímetro
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
DMAPP	Dimetilalildifosfato
E	Ecdisona
EHZD	Extrato aquoso de <i>Zornia diphylla</i>
g	Grama
HCl	Ácido Clorídrico
HPLC	“High Performance Liquid Chromatograph” - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IAn	Índice Anafásico
IFs	Índice de Fases
IM	Índice Mitótico
IMe	Índice Metafásico
IPP	Isopentenildifosfato
IPr	Índice Profásico
ITe	Índice Telofásico
Kg	Quilo
L	Litro
M	Molar
m	Metro
mA	Miliabsorvância
MEP	Metileritritolfosfato

mg	Miligrama
mm	Milímetro
mL	Mililitro
MMS	Metil Metano Sulfonato
MN	Micronúcleo
NCD	Número de células em divisão
NCF	Número de células da respectiva fase
ng	Nanogramas
NIQUA	Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica
nm	Nanômetro
NTC	Número total de células analisadas
NTCD	Número total de células em divisão analisadas
OMS	Organização Mundial de Saúde
p/v	Peso por volume
T1	Tratamento 1
T2	Tratamento 2
T3	Tratamento 3
T4	Tratamento 4
T5	Tratamento 5
T6	Tratamento 6
SQR	Substância Química de Referência
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFV	Universidade Federal de Viçosa
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
v/v	Volume por volume
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1	O USO DE PLANTAS MEDICINAIS E A PROSPECÇÃO DE EFEITOS BIOLÓGICOS.....	3
2.2	<i>Pfaffia glomerata</i> (AMARANTHACEAE).....	7
2.3	GENOTOXIDADE E O TESTE EM <i>Allium cepa</i> L.....	14
3	OBJETIVOS	20
3.1	Objetivo geral.....	20
3.2	Objetivos específicos.....	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	21
4.2	MODELO DE ESTUDO.....	21
4.3	PREPARO DOS EXTRATOS E SOLUÇÕES DE <i>B</i> -ECDISONA.....	21
4.3.1	Extrato metanólico.....	21
4.3.2	Soluções de β -ecdisona.....	23
4.3.3	Extrato aquoso.....	23
4.4	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS.....	24
4.4.1	Teor de β -ecdisona.....	24
4.5	ENSAIOS DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO RADICULAR PARA ESCOLHA DAS CONCENTRAÇÕES TESTADAS NOS ENSAIOS DE CITOGENOTOXIDADE.....	25
4.6	ENSAIOS DE CITOGENOTOXIDADE.....	26
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	27
5	RESULTADOS	28
5.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS.....	28
5.1.1	Teor de β -ecdisona.....	28
5.2	ENSAIOS DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO RADICULAR PARA ESCOLHA DAS CONCENTRAÇÕES TESTADAS.....	30
5.3	ENSAIOS DE CITOGENOTOXIDADE.....	31
5.3.1	Extrato metanólico.....	31

5.3.2	β -ecdisona	37
5.3.3	Extrato aquoso.....	41
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÕES	56
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais com fins terapêuticos foi reconhecido pela Organização Mundial de Saúde em 1978 (YAMADA, 1998) e até hoje diversas espécies vegetais são utilizadas na medicina popular em todo o mundo (FRANCO et al., 2011). De acordo com Moraes et al. (2011), define-se como planta medicinal todo vegetal que contém, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser empregadas para fins terapêuticos, ou seus precursores. Espécies vegetais são muito exploradas pela indústria farmacêutica, pois são uma importante fonte para a identificação, caracterização e isolamento de compostos biologicamente ativos. As plantas medicinais são empregadas com fins terapêuticos pela população para o tratamento de diversas enfermidades e podem ainda ser empregadas como pesticidas/herbicidas naturais, em substituição aos compostos sintéticos, que são poluentes e tóxicos para o meio ambiente. No entanto, é preciso considerar que seu uso indiscriminado e em doses excessivas pode trazer prejuízos à saúde humana. Por isso, é indispensável o conhecimento detalhado tanto acerca das características morfológicas e botânicas das espécies quanto sobre sua composição química e seus efeitos sobre as células de organismos vivos.

Entre os possíveis efeitos adversos do uso de plantas medicinais estão as lesões causadas sobre o material genético e/ou alterações sobre o ciclo celular, conjuntamente denominados de efeitos citogenotóxicos (MAHMOOD et al., 2012). Esses efeitos podem ser investigados através de ensaios biológicos que utilizam diferentes organismos indicadores, dentre eles bactérias, insetos, poliquetas, peixes, anfíbios, roedores, humanos e diversas espécies vegetais (NOLDIN et al., 2003). Considerando os modelos vegetais, pode-se citar o sistema de teste de *Allium cepa* como um dos testes mais utilizados para avaliar efeitos citogenotóxicos de substâncias químicas e amostras ambientais (LEME e MARIN-MORALES, 2009). O teste de *A. cepa*, descrito em 1938 por Levan, baseia-se no uso de células meristemáticas da raiz de cebola para a avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos e apresenta vantagens por permitir a avaliação simultânea de diversos parâmetros, como os efeitos sobre a germinação e sobre o

índice mitótico, a presença de alterações cromossômicas e nucleares e ainda a formação de micronúcleos (LEME e MARIN-MORALES, 2009; OLIVEIRA et al., 2012a; ONYEMAOBI et al., 2012).

Diversos trabalhos tem avaliado o efeito citogenotóxico de produtos de origem vegetal utilizando o ensaio de *Allium cepa*, como os extratos aquosos de *Derris rariflora* (POLETTTO et al., 2011), *Helicrysum plicatum* (EROGLU et al., 2010) e *Passiflora alata* (BOEIRA et al., 2010), da polpa dos frutos de *Malpighia glabra* L. (DUSMAN et al., 2012), extratos etanólicos de *Maytenus rigida* e *Aristolochia birostris* e óleos essenciais de espécies de *Heterothalamus* spp. (SILVA et al., 2011a)

O presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos citogenotóxicos dos extratos metanólico e aquoso da espécie vegetal *Pfaffia glomerata* e da substância β -ecdisona isolada, através do teste de *Allium cepa*. A espécie é popularmente conhecida como ginseng brasileiro por apresentar propriedades químicas e farmacológicas semelhantes ao *Panax ginseng* (ginseng coreano) (OLIVEIRA, 1980) e é utilizada como tônico e afrodisíaco, no tratamento para diabetes, doenças reumáticas, esgotamento físico e mental, estresse e lapsos de memória. No entanto, já foram relatados efeitos adversos ao seu uso, tais como hipertensão, efeito estrogênico, nervosismo, insônia, erupções cutâneas e diarreia (RATES e GOSMANN, 2002).

Apesar dos efeitos adversos causados pela ingestão de *P. glomerata* já relatados na literatura, não há estudos que abordem seus efeitos citogenotóxicos utilizando o sistema de teste de *Allium cepa* como modelo. Assim, com o presente trabalho, pretende-se contribuir para o conhecimento dos efeitos da espécie e de sua caracterização química, subsidiando o seu uso correto e consciente pela população.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O USO DAS PLANTAS MEDICINAIS E A PROSPECÇÃO DE EFEITOS BIOLÓGICOS

A existência de documentos escritos e mesmo a preservação de plantas antigas evidencia que o uso de plantas medicinais é tão antigo quanto a própria humanidade. A mais antiga evidência escrita do uso de plantas medicinais data de 5000 anos e é composta de 12 receitas descrevendo o uso de aproximadamente 250 plantas (PETROVSKA, 2012).

A ciência contemporânea tem reconhecido a ação das plantas medicinais, e a farmacoterapia moderna inclui nas suas ações o uso de diversos medicamentos de origem vegetal (PETROVSKA, 2012). A Organização Mundial da Saúde reconheceu o uso destas plantas em 1978 (YAMADA, 1998).

As espécies medicinais podem ser utilizadas de diversas maneiras: popularmente elas são empregadas no preparo de extratos, infusões entre outras formulações com finalidades terapêuticas (SAMUELSSON, 2004; BALUNAS e KINGHORN, 2005). Já na indústria, elas podem servir para a identificação, isolamento e caracterização de substâncias biologicamente ativas, que são aquelas que apresentam alguma atividade sobre o metabolismo de um ou vários organismos vivos (BALUNAS e KINGHORN, 2005).

As plantas são consideradas uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas e as substâncias que apresentam essa característica têm grande importância econômica e agregam valor à espécie de onde foram isoladas (BERG e LUBERT, 2008). De modo geral, estas substâncias são produzidas a partir das reações do metabolismo secundário destas espécies (CHAMPE et al., 2008). Entre as diversas aplicações da identificação de substâncias biologicamente ativas está o seu emprego como medicamentos na saúde humana. As plantas são uma importante fonte na descoberta de novos produtos com importância medicinal no desenvolvimento de novos fármacos (HUSSAIN et al., 2012). Atualmente, cerca de 80% das moléculas empregadas em terapia são de origem natural ou são moléculas

sintéticas inspiradas em moléculas naturais (KATIYAR et al., 2012). Os exemplos são diversos, como a morfina que foi isolada a partir da planta *Papaver somniferum* há cerca de 200 anos. Inúmeros outros exemplos são listados na Tabela 1.

Tabela 1. Exemplos de drogas originadas a partir de substâncias isoladas em plantas.

Droga	Planta	Aplicação	Referência
Taxol	<i>Taxomyces andreanae</i>	Antineoplásico	Kumaran et al, 2012
Camptotecina	<i>Camptotheca acuminata</i>	Antineoplásico	Guirado e Cuéllar, 2008
Podofilotoxina	<i>Podophyllum emodi</i>	Antiverrucoso	Ram, 2010
Vinblastina	<i>Vinca rosea</i>	Antineoplásico	Siddiqui et al., 2011
Vincristina	<i>Vinca rosea</i>	Antineoplásico	Siddiqui et al., 2011
Quinina	<i>Cinchona spp</i>	Analgésico e antimalárico	Dolabela et al., 2012
Atropina	<i>Atropa belladonna</i>	Antiespasmódico e inibidor de função secretora	Mária e Rosilda, 2010
Codeína	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico e antitússico	Stranska et al., 2013
Colchicina	<i>Colchicum autumnale</i>	Tratamento de gota, amiloidose e escleroderma	Freitas et al., 2010
Digoxina	<i>Digitalis lanata</i>	Tratamento de problemas cardíacos	Sharma et al., 2013
Etoposídeo	<i>Podophyllum peltatum</i>	Antineoplásico	Mesquita, 2010
Artemisinina	<i>Artemisia annua</i>	Antimalárico	Efferth et al., 2011

Outra importante aplicação das substâncias isoladas a partir de plantas, e neste caso, não só a partir de plantas medicinais, é o seu emprego como pesticidas naturais em substituição aos pesticidas sintéticos (GAHUKAR, 2012). Em uma análise recente na literatura foi possível encontrar alguns trabalhos onde patógenos foram controlados com o uso de produtos de origem vegetal (extratos e óleos vegetais, entre outros) (Tabela 2). Muitas substâncias de origem vegetal podem também ser utilizadas como herbicidas (DUKE et al., 2000).

Entre as diversas aplicações/ações das plantas até aqui descritas, podemos citar como exemplos, as atividades conhecidas como adaptógenas. O termo adaptógeno ou resistógeno foi introduzido inicialmente em 1947 pelo cientista russo

Nikolai Lazarev (MENDES et al., 2011; PAWAR e HUGAR, 2012). Em um experimento, ele descreveu a possível atividade adaptogênica do dibazol (2-benzil-benzimidazol) em estimular a resistência não específica, com o objetivo de melhorar a condição física de soldados, atletas e trabalhadores sem a utilização de estimulantes perigosos (PAWAR e HUGAR, 2012).

Tabela 2. Exemplos de espécies vegetais utilizadas no controle de doenças em plantas.

Planta	Material utilizado	Patógeno controlado	Referência
<i>Allium sativum</i>	Óleo essencial (bulbo)	<i>Fusarium oxysporum</i> (fungo)	Sharma et al., 2010
<i>Allium sativum</i>	Óleo essencial (bulbo)	<i>Alternaria alternata</i> (fungo)	Sharma et al., 2010
<i>Azadirachta indica</i>	Extrato de semente	<i>Urentius sentis</i> (inseto);	Patil et al., 2011
<i>Azadirachta indica</i>	Extrato de semente	<i>Aphis gossypii</i> (inseto);	Patil et al., 2011
<i>Azadirachta indica</i>	Extrato de semente	<i>Cercospora rauvolfiae</i> (fungo)	Arumugam et al., 2010
<i>Brassica juncea</i>	Semente	<i>Meloidogyne incognita</i> (nematóide);	Seenivasan, 2011
<i>Brassica juncea</i>	Semente	<i>Erwinia chrysanthemi</i> (bactéria)	Sharma et al., 2010
<i>Crotalaria juncea</i>	Semente	<i>Meloidogyne incognita</i> (nematóide)	Seenivasan, 2011
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Extrato da folha	<i>Cercospora rauvolfiae</i> (fungo)	Arumugam et al., 2010
<i>Ricinus communis</i>	Semente	<i>Meloidogyne incognita</i> (nematóide)	Seenivasan, 2011
<i>Tagetes erecta</i>	Semente	<i>Meloidogyne incognita</i> (nematóide)	Seenivasan, 2011

Por definição, os adaptógenos são substâncias ou grupos de substâncias ativas oriundas do metabolismo de plantas, que incrementam respostas metabólicas e adaptativas dos seres vivos (WAGNER et al., 1994). São agentes que permitem que o organismo neutralize estresses químicos, físicos ou biológicos através de uma resistência não específica. São considerados também como capazes de reduzir a intensidade e os impactos negativos causados por tensões mentais, dificuldades

emocionais, doenças, infecções, esgotamento físico, entre outros. A administração de uma substância adaptógena permite ainda que o organismo se torne pré-adaptado, sendo capaz de responder mais apropriadamente às exigências a ele impostas (MAHESHWARI et al., 2012). Além disso, estes compostos também têm influência sobre o sistema imunológico e nervoso, podendo agir como imunomoduladores ou imunoestimulantes e/ou melhorando suas funções. O uso de adaptógenos permite, portanto, o funcionamento harmônico do corpo humano e é indicado para tratar diversas patologias, como diabetes, insônia, câncer, neurastenia, gastrite, hipertensão, dispepsia, fadiga, entre outras (MENDES, 2011).

Os adaptógenos podem ser encontrados em diversos organismos, podendo ser isolados de origens muito diferentes e apresentar mecanismos de ação distintos, embora a maioria tenha o mesmo efeito farmacológico (FRAGA, 2004; KIM, 2012). As primeiras pesquisas sobre efeitos dessa classe de substâncias foram realizadas pelo Dr. Brekhman, no final dos anos 1950, com a espécie *Panax ginseng* C.A. Mey (Araliaceae), conhecida como ginseng coreano (PAWAR e HUGAR, 2012). As raízes desta espécie são amplamente empregadas na medicina popular e ela é considerada até hoje um dos melhores exemplos de planta adaptógena (MENDES, 2011). Na Coreia, na China e no Japão, o *Panax ginseng* é considerado a erva medicinal mais valiosa. O nome “panax” significa “cura tudo” e ilustra a crença de que o ginseng possui propriedades capazes de curar todos os males do corpo (KIM, 2012). Outras espécies também são conhecidas como ginseng, por apresentarem características semelhantes ao ginseng coreano. Dentre elas, pode-se citar *Panax notoginseng* (ginseng chinês), *Panax quinquefolium* L. (ginseng americano), além de *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia paniculata* (ginseng brasileiro) (KIM, 2012). Em uma revisão sobre os mecanismos moleculares e aplicações do ginseng coreano, Kim (2012) atribuiu as propriedades farmacêuticas da espécie à presença de ginsenosídeos.

De forma geral, as espécies ricas em ginsenosídeos (saponinas triterpênicas) apresentam capacidade de inibir a produção de radicais livres, estimular a produção de óxido nítrico, melhorar a circulação sanguínea e o tônus muscular. No entanto, como o modo de ação destas substâncias ainda não é totalmente conhecido, são necessários estudos futuros acerca dos mecanismos de ação, com ênfase nas relações de especificidade entre estrutura e função dos ginsenosídeos, bem como

sobre o seu potencial tóxico, tanto em modelos animais como em humanos (KIM, 2012).

De acordo com Mendes (2011), as espécies mais conhecidas como adaptógenas em todo o mundo são *Bryonia alba* L., *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim, *Ocimum sanctum* L., *Panax ginseng* C.A. Mey, *Panax quinquefolius* L., *Rhodiola rosea* L., *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. e *Withania somnifera* Dunal. No Brasil, várias espécies vegetais apresentam propriedades adaptógenas, e estas são geralmente conhecidas pela população como tônicos, afrodisíacos, fortificantes, estimulantes e revigorantes (MENDES e CARLINI, 2007; MENDES, 2011). Alguns exemplos são *Paullinia cupana* Kunth (guaraná), *Ptychopetalum olacoides* Benth (muirapuama), *Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen (ginseng brasileiro), *Turnera diffusa* Willd. ex Schult (damiana), *Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach (nó-de-cachorro) e *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld ex de Souza (catuaba) (MENDES, 2011).

Como pode ser observado pelo exposto, o uso de plantas medicinais apresenta resultados efetivos no tratamento de muitas enfermidades, como febre, insônia, diarreia, problemas reprodutivos, circulatórios e respiratórios, infecções parasíticas, entre outros (EDDOUKS et al, 2012). Adicionalmente, tem-se ainda as plantas consideradas como adaptógenas que podem induzir uma melhora geral, não específica nas condições físicas e fisiológicas de um organismo. *Pfaffia glomerata* representa uma das espécies com essa propriedade e é nativa do Brasil.

2.2 *Pfaffia glomerata* (AMARANTHACEAE)

A família Amaranthaceae é composta por 2360 espécies distribuídas em 170 gêneros (FANK-DE-CARVALHO et al., 2012), que podem ser encontradas nos trópicos, subtropicais e regiões temperadas da América e da África (SOUZA e LORENZI, 2005; MARCHIORETTO et al., 2010). Sabe-se que 196 espécies são encontradas no Brasil, distribuídas em 20 gêneros e 70% destas são encontradas no Cerrado (FANK-DE-CARVALHO et al., 2012).

Pelo menos 22 espécies de Amaranthaceae são utilizadas na medicina popular brasileira, com destaque para *Hebanthe eriantha* (Poir.) Pedersen e *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. Estas duas espécies são comercializadas na forma de cápsulas, compostas por pó de raiz concentrado (FANK-DE-CARVALHO et al., 2012).

O gênero *Pfaffia* Mart. apresenta cerca de 90 espécies naturais da América Central e América do Sul, sendo pelo menos 33 descritas no Brasil (ZIMMER et al., 2006; MARCHIORETTO et al., 2010). *P. glomerata*, *P. iresinoides* (Kunth.) Spreng e *P. paniculata* (Mart) O. Kuntze são conhecidas como ginseng brasileiro, por apresentarem características semelhantes ao ginseng coreano (*Panax ginseng*).

As espécies de ginseng brasileiro são comumente utilizadas como tônico e afrodisíaco, no tratamento para diabetes, doenças reumáticas, esgotamento físico e mental, estresse e lapsos de memória (TEIXEIRA, 2011), pois apresentam adaptógenos, que induzem o aumento da resistência inespecífica, permitindo ao organismo uma melhor adaptação aos esforços físicos e mentais (MAHESHWARI et al., 2012).

A espécie *Pfaffia glomerata* é empregada há séculos pelos indígenas brasileiros, para a cura e prevenção de doenças e como tônico geral e rejuvenescedor (LORENZI e MATTOS, 2002). No entanto, suas propriedades medicinais só foram comprovadas após o isolamento do resistógeno β -ecdisona de suas raízes (NISHIMOTO et al., 1987; NISHIMOTO, 1988; NISHIMOTO et al., 1990; SHIOBARA et al., 1993). Além disso, a descoberta do ácido páfico em *Pfaffia paniculata* aumentou o interesse pelas espécies do gênero, já que esta substância apresentou atividades anti-tumorais (NISHIMOTO, 1984).

P. glomerata é uma erva perene, com caules retos, delgados e ocos, podendo atingir até dois metros de altura. Apresenta raiz fusiforme e inflorescência bastante ramificada, com flores polígamo-monóicas (VIGO et al., 2004). É uma espécie higrófila e heliófita, amplamente distribuída pelo território nacional, especialmente em áreas ensolaradas e de matas ciliares, apresentando melhor desenvolvimento a temperaturas mais elevadas (OLIVEIRA, 2012b). Além disso, apresenta alta adaptabilidade e crescimento rápido (VIGO et al., 2004).

De acordo com Marchioretto et al. (2010), a espécie, nativa do Brasil, também encontra-se distribuída no México, Guianas, Bolívia, Colômbia, Paraguai, Argentina

e Uruguai. Está presente principalmente nas regiões da Amazônia, do Cerrado e da Mata Atlântica (OLIVEIRA, 2012b) e é naturalmente encontrada nos estados do Paraná, Mato Grosso e São Paulo (SIQUEIRA, 1986) e, ocasionalmente, no Nordeste (CHISAKI et al., 1998). Em condições naturais, ocorre principalmente à beira de rios e nas orlas das matas de galeria, onde pode receber bastante luz (SMITH e DOWNS, 1972), em altitudes de até 1000m e em regiões com precipitação pluviométrica entre 1200 e 1500mm anuais (CORREA JÚNIOR et al., 2002). Trabalhos realizados por Ribeiro e Pereira (1994), Montanari et al. (1999) e Bentes et al. (2000), mostraram que *P. glomerata* pode se desenvolver também em solos drenados, tanto argilosos, quanto arenosos.

Segundo Oliveira (2012b), grande parte do fornecimento mundial de *Pfaffia* é proveniente do Brasil, em virtude das condições ecológicas demandadas pela espécie (ALCÂNTARA, 1994; OLIVEIRA, 2012b). Em 1995, cerca de 120 toneladas de *Pfaffia* spp. foram exportadas para o Japão (MING e CORRÊA JÚNIOR, 2002) e dados recentes mostram que só no período de janeiro a maio de 2012, foram exportadas quase duas toneladas de raízes de ginseng (MDIC, 2012), principalmente para os Estados Unidos e União Européia (OLIVEIRA, 2012b).

Quimicamente, as raízes de *P. glomerata* são ricas em saponinas triterpênicas e ecdisteroides (CARULO, 2012), sendo a β -ecdisona o composto de maior interesse comercial. Festucci-Buseli et al. (2008) avaliaram a quantidade desta substância em diferentes acessos de *P. glomerata* e demonstraram que as raízes e flores são os principais órgãos acumuladores do metabólito. No entanto, sabe-se que a extração de β -ecdisona com interesse comercial é realizada principalmente a partir das raízes da planta (TANAKA et al., 1995; OLIVEIRA, 2012b). Alguns estudos mostram que o teor deste metabólito em raízes secas pode variar entre 0,29 e 0,76% (NISHIMOTO et al., 1987; NISHIMOTO et al. 1990; e CORRÊA JÚNIOR e MING, 2008).

A estrutura básica dos fitoecdisteroides compreende um esqueleto esteroidal, formado por um sistema de anéis, onde se liga uma cadeia lateral alifática. Apresentam várias hidroxilas, cujo número, posição e orientação, diferenciam os fitoecdisteroides (FLORES, 2009). Em espécies de *Pfaffia*, o ecdsterioide mais encontrado é β - ecdisona (C₂₇H₄₄O₇). Sua estrutura química está representada na Figura 1.

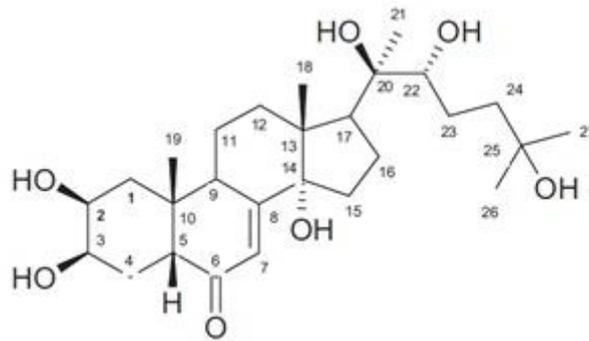


Figura 1. Estrutura química do ecdisteroide β -ecdisona ($C_{27}H_{44}O_7$). Fonte: Sá Barreto et al. (2005).

A biossíntese dos fitoecdisteroides envolve a rota acetato-mevalonato, que ocorre no citosol e, provavelmente, do fosfato metileritritol (MEP), que ocorre nos cloroplastos. As rotas do ácido mevalônico e do MEP levam à formação de difosfato de isopentinila (IPP) e do difosfato de dimetilalila (DMAPP), respectivamente. Estes dois compostos são isômeros e se unem para formar intermediários de vários terpenóides (CROTEAU et al., 2000; KLEIN, 2004).

Estudos conduzidos em *Polypodium* demonstraram que o ecdisteroide ecdisona (E) é o precursor de vários outros ecdisteroides com 27 carbonos, como a β -ecdisona, que também é conhecida como 20-hidroxiecdisona, polipodine A ou ecdisterona. Sabe-se que a produção da β -ecdisona a partir da ecdisona é catalisada pela enzima ecdisona 20-monoxigenase, e envolve a adição de um átomo de oxigênio no carbono 20. Além disso, em estudos com *Zea mays*, a ecdisona (E), conjugada com o fosfato mostrou influência no transporte dos ecdisteroides, bem como na regulação do metabolismo destes compostos (GREBENOK et al., 1994).

A ação adaptógena de *P. glomerata* é atribuída à presença destes fitoecdisteroides, especialmente a β -ecdisona (FIGUEIREDO, 2004), que é a substância utilizada como marcador químico da qualidade das raízes comercializadas (ALVES, 2008). No entanto, de acordo com Lee et al. (1994), outros metabólitos também podem ser produzidos a partir da rota do ácido mevalônico e do MEP, como as saponinas pentacíclicas e os fitoesteroides, e estes também podem ser encontrados em espécies de *Pfaffia*.

Em um estudo farmacognóstico realizado por Vigo et al. (2004) foi possível observar que as raízes de *P. glomerata* apresentam 342 ± 65 para o índice de espuma; $4,2 \pm 0,5\%$ de cinzas totais; $0,11 \pm 0,09\%$ de cinzas insolúveis e $53,4 \pm 3,8\%$ de conteúdo de extrato aquoso. Shiobara et al. (1993) isolaram um novo pigmento amarelo das raízes de *P. iresinoides*, outra espécie do gênero. Em 1993, os mesmos autores verificaram a existência de ácido oleanólico, ecdisterona, rubrosterona e β -glucopiranosil oleanolato em raízes de *P. glomerata* e isolaram ainda dois novos compostos, o ácido triterpênico e o ácido noriterpênico pfamérico.

Diversos estudos relataram efeitos biológicos de extratos de *Pfaffia glomerata* e os efeitos farmacológicos mais bem documentados do ginseng brasileiro são antiestresse, imunomodulatório e inibitório da agregação plaquetária (RATES e GOSMANN, 2002). Alcântara et al. (1994), concluíram que o extrato das raízes, preparado com acetato de etila, inibiu o crescimento de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus fecalis*. Neste mesmo estudo, isolaram esteroides, terpenos e fenóis. Alvim et al. (1999), em um estudo acerca dos efeitos de extrato metanólico de *P. glomerata* mostraram que este apresenta efeito contra o molusco *Biomphalaria glabrata* e relacionaram esta atividade à presença de saponinas hemolíticas. Além disso, Neto (2003), verificou que o extrato hidroalcoólico das raízes de *P. glomerata* possui atividade *in vitro* contra *Leishmania brasiliensis*. Estudos farmacológicos mostraram ainda diminuição no tempo de sono de camundongos tratados agudamente com extrato de *P. glomerata*, indicando um perfil de ação estimulante, bem como efeitos positivos na aprendizagem e memória de ratos idosos tratados cronicamente com o mesmo extrato (Marques, 1998).

Silva et al. (2010) avaliaram o efeito de extratos de *Pfaffia paniculata* nos processos de proliferação celular, indução de apoptose e comunicação celular, usando ratos como organismo modelo. Os resultados mostraram aumento da proliferação celular para o tratamento de 10% e aumento significativo de corpos apoptóticos para os tratamentos de 2 e 10%, quando comparados com o controle negativo. Estes efeitos corroboram com o já encontrado em estudos anteriores e foram relacionados à presença de saponinas triterpênicas nas raízes de *P. paniculata* por diversos autores (KORATKAR e RAO, 1997; WAKABAYASHI et al., 1998; WATANABE et al., 2000; HARIDAS et al., 2001; MUJOO et al., 2001; LIN et al., 2003; LI et al., 2005; LEMESHKO et al., 2006).

Em estudo sobre o potencial anti-hiperglicemiante de extratos de *P. glomerata*, Sanches et al. (2001), concluíram que o extrato metanólico bruto apresentou atividade hipoglicemiante em ratos da linhagem *Wistar*, utilizando-se doses acima de 50mg/Kg. No entanto, não foi possível correlacionar este efeito com a presença do ecdisteroide β -ecdisona. Assim, o mecanismo de ação do extrato sobre a taxa glicêmica dos ratos testados não foi elucidado.

Em outro trabalho realizado com fêmeas grávidas da linhagem *Wistar* tratadas com extrato aquoso de *P. glomerata*, foi comprovado efeito anti-implantação do blastocisto, além de abortos, reabsorção de fetos em formas de cistos, hemorragias em várias partes do corpo, pele fina e pegajosa, ausência de rigidez axial e alteração do tamanho dos fetos, quando comparados aos do tratamento controle. Estes resultados sugerem um efeito tóxico dos extratos testados (TOLEDO et al., 2002). Segundo Marques (1998), em humanos, o extrato de *P. glomerata* foi capaz de melhorar o desempenho de idosos normais em testes psicométricos, particularmente na memória de curto prazo e memória declarativa.

Otofujii (2005) mostrou que o extrato hidroalcoólico com 50% de raízes de *P. glomerata* apresenta capacidade de proteger a mucosa gástrica e o extrato hidroalcoólico a 70% foi capaz de reduzir a secreção gástrica. Os efeitos de proteção gástrica observados foram relacionados à presença de triterpenos e ecdisteroides nos dois extratos testados. Já Fenner et al. (2008) mostraram efeito hipnótico (sedativo) de extrato etanólico de raízes de *P. glomerata* e relacionaram o efeito ao componente ecdisterona. Moura et al. (2011), demonstraram atividade antimicrobiana contra patógenos da cavidade bucal de extratos de *P. glomerata* e sugeriram seu uso para a prevenção de cáries dentárias. A β -ecdisona é considerada também um dos ecdisteroides mais importantes para o uso em formulações cosméticas, apresentando função hidratante, pois fortalece a barreira hídrica da pele e impede a perda excessiva de água e, por isso, é usada na prevenção do envelhecimento precoce. A extração de β -ecdisona é realizada também com outros objetivos, como analgésica, feromônio no controle de insetos e como inibidor da proliferação de microrganismos (ARLETTI et al., 1999, CARULO, 2012). De acordo com Gomes et al. (2010) a β -ecdisona também apresenta capacidade de elevar a oxigenação celular.

As saponinas triterpênicas também são encontradas em raízes de *P. glomerata*, assim como em *P. paniculata* (SILVA et al., 2012a). Já foram isolados seis diferentes derivados de ácido pfáico, sendo cinco deles já relacionados à inibição de melanomas e alguns são considerados eficientes no controle de níveis de açúcar no sangue (CARULO, 2012). Além disso, dois esteroides ocorrem naturalmente em espécies de *Pfaffia*, o sitosterol e o stigmasterol. Estudos mostram a ação destes esteroides na redução da produção de estrógeno e na redução dos níveis de colesterol (CARULO, 2012).

Análises nutricionais mostraram que espécies de *Pfaffia* geralmente apresentam 19 diferentes aminoácidos, elevado número de eletrólitos e minerais como ferro, magnésio, cobalto, sílica, zinco e vitaminas A, B-1, B-2, E e K, além do ácido pantotênico (NAKAI et al., 1984; OLIVEIRA, 1980).

Dentre os efeitos adversos já documentados para o uso de *Pfaffia glomerata*, os principais são hipertensão e potencial efeito estrogênico. Em usuários crônicos ou que consomem altas doses, pode ocorrer o desenvolvimento da “Síndrome de Abuso de Ginseng”, caracterizada por hipertensão, nervosismo, insônia, erupções cutâneas e diarreia. A dose diária recomendada não deve ser superior a 2g do pó da raiz (padronizado em 1,5% de ginsenosídeos/fafosídeos), por um período consecutivo de no máximo três meses (RATES e GOSMANN, 2002). As cápsulas comerciais geralmente contêm 300mg de pó de raiz e são utilizadas pela população sem controle adequado, o que pode levar a uma superdosagem do produto. Além disso, muitos consumidores ingerem chás, infusões e decoctos preparados a partir de raízes obtidas em feiras e mercados locais.

Apesar do uso consagrado de *Pfaffia glomerata* pela população, não há registros acerca da padronização do uso e produção deste fitoterápico na Farmacopéia Brasileira. Tendo em vista os diversos efeitos biológicos já relatados para a espécie, seu uso seguro com fins terapêuticos depende ainda do conhecimento aprofundado de suas propriedades farmacológicas e do desenvolvimento de tecnologias de produção e controle de qualidade, bem como de ensaios mais detalhados acerca de seus efeitos adversos, para subsidiar seu uso correto pela população.

2.3 GENOTOXIDADE E O TESTE EM *Allium cepa* L.

Como discutido anteriormente, diversos compostos podem ser isolados de espécies vegetais, compreendendo uma ampla variedade de estruturas, propriedades físico-químicas e biológicas. No entanto, sabe-se que nem todos os componentes presentes nas plantas são totalmente conhecidos. Dados recentes indicam que cerca de 99% das plantas medicinais endêmicas do Brasil ainda não tiveram seus princípios ativos identificados (FÃO et al., 2012). Além disso, poucas espécies empregadas na medicina popular foram investigadas quanto aos seus efeitos adversos, fato que torna ainda mais preocupante o seu uso indiscriminado.

Entre os possíveis efeitos adversos ao uso de plantas medicinais estão a toxidez e as lesões causadas sobre o material genético e/ou alterações sobre o ciclo celular, em conjunto denominados efeitos citogenotóxicos. Estas alterações podem ser clastogênicas (indução de quebras cromossômicas) ou aneugênicas (perda cromossômica). Agentes químicos, físicos ou biológicos que induzem mutações nas células são conhecidos como compostos mutagênicos. Estes efeitos podem ser avaliados por diversos ensaios biológicos e um dos mais consagrados utiliza células meristemáticas de *Allium cepa* L. (LEME E MARIN-MORALES, 2009). O uso de *Allium cepa* como organismo modelo foi proposto por Albert Levan em 1938 (FISKESJÖ, 1985; RANK e NIELSEN, 1993) e é um dos modelos mais utilizados (BAUMGARTNER et al., 2012), por ser considerado um teste padrão para a avaliação e classificação da toxidez de substâncias químicas e amostras ambientais (FISKESJÖ, 1985; MENEGUETTI et al., 2012).

Allium cepa é considerada uma espécie eficiente para o teste de citogenotoxicidade devido à sua cinética de proliferação celular, ao crescimento rápido de suas raízes, elevado percentual de células em divisão que podem ser facilmente observadas, alta tolerância a diferentes condições de cultivo, disponibilidade durante todo o ano, fácil manuseio e por possuir número reduzido de cromossomos ($2n=16$) sendo estes relativamente grandes em comparação com outras espécies (FISKESJÖ, 1985; MACAN et al., 2012). O teste proporciona ainda resultados rápidos e de baixo custo (GRANT, 1994), que apresentam boa correlação com dados obtidos em ensaios com modelos animais (OLIVEIRA et al., 2012a).

De acordo com Leme e Marin-Morales (2009), o ensaio de *A. cepa* é um método confiável para a determinação rápida da presença de substâncias tóxicas no meio ambiente, para o monitoramento dos níveis de poluição em ambientes naturais e para a avaliação de efeitos tóxicos. O teste é capaz de indicar a presença de substâncias tóxicas, citotóxicas e até mutagênicas que colocam em risco a sobrevivência dos organismos (FERREIRA et al., 2012). Por isso, é um dos bioensaios mais utilizados para avaliação de danos nos cromossomos e na formação do fuso mitótico (OLIVEIRA et al., 2012a), para detecção de micronúcleos (XAVIER et al., 2011), e variações no percentual de células em divisão (LEME e MARIN-MORALES, 2008).

Desde sua descrição, várias estratégias têm sido utilizadas em *A. cepa* para a detecção de citogenotoxicidade. Entre as mais comuns está a análise de parâmetros citogenéticos, como, índice mitótico e percentuais de alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais (YILDIZ et al., 2009; KURÁS et al., 2009; TEERARAK et al., 2009; SOUSA et al., 2009).

De modo geral, os percentuais de células em divisão (índice mitótico) e de alterações cromossômicas são calculados como uma resposta às dosagens ou tratamentos diferenciados com determinado composto ou substância. O decréscimo ou aumento destes percentuais podem ser considerados parâmetros seguros para determinar a presença de agentes citotóxicos (SMAKA-KINCL et al., 1996). Já a análise de alterações cromossômicas em todas as fases da divisão celular, como proposto inicialmente por Fiskesjö (1985), torna a avaliação dos efeitos mais compreensiva, uma vez que promove uma melhor investigação dos mecanismos de ação dos agentes testados. Diversos tipos de alterações cromossômicas podem ser detectados, como pontes em anáfase e telófase, segregação desigual ou tardia de cromossomos, ascensão precoce de cromossomos, perda de cromossomos, fragmentação cromossômica, multipolaridade em anáfase e telófase, c-metáfases e indução de cromossomos aderentes. Alterações como pontes e fragmentos são indicativos de efeitos clastogênicos, enquanto perda de cromossomos, segregação tardia, ascensão precoce, multipolaridade e c-metáfases são indicativos de efeitos aneugênicos (LEME e MARIN-MORALES, 2009; GUSTAVINO et al., 2012).

Com este teste também é possível avaliar a frequência de micronúcleos (MN), que resulta da perda de fragmentos ou cromossomos inteiros durante a divisão

celular. A presença de micronúcleos pode indicar efeitos mutagênicos em organismos eucariotos, como clastogênese e danos no fuso mitótico (SILVA et al., 2011b). Para que os micronúcleos sejam visualizados, é necessária a ocorrência de uma divisão celular após a ocorrência mutagênica. Por isso, deve-se fazer o cultivo celular ou utilizar células que se multiplicam continuamente, como células de medula óssea e de raízes (VILLELA e LAU, 2003). A avaliação de micronúcleos em *Allium cepa* é considerada uma das mais confiáveis para estudos de monitoramento ambiental e mutagenicidade de plantas medicinais (GAVRONSKI, 2008), devido à sua sensibilidade e exatidão e porque suas raízes apresentam processo de divisão celular similares aos do homem (MENEGUETTI et al., 2011).

O sistema de teste com *Allium cepa* vem sendo utilizado para avaliar os efeitos de diversos tipos de substâncias. Estudos registrados na literatura citam o uso do teste para avaliação de efeitos de óleos essenciais (SILVA et al., 2011a), extratos de plantas (FÃO et al., 2012), misturas complexas (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012), metais pesados (MASOOD e MALIK, 2013; QIN et al., 2013; MIHALESCU et al., 2012), pesticidas (ANANTHAKRISHNAN et al., 2012), produtos de desinfecção de águas (GUSTAVINO et al., 2012), hidrocarbonetos aromáticos (JADHAV et al., 2012), entre outros.

Diversos são os trabalhos que utilizam ensaios vegetais (principalmente o de *Allium cepa*) ou animais para a avaliação da atividade citogenotóxica de plantas. Akinboro e Bakare (2007) testaram a ação do extrato aquoso de cinco plantas medicinais utilizadas na medicina popular da Nigéria: *Azadirachta indica* (“nim” - Meliaceae), *Morinda lucida* (Rubiaceae), *Cymbopogon citratus* (Graminae), *Mangifera indica* (“manga” - Anarcadiaceae) e *Carica papaya* (“mamão” - Caricaceae) em células de *Allium cepa*. Os resultados mostraram diminuição do índice mitótico de acordo com o aumento da dose dos extratos de *M. lucida*, *M. indica* e *C. papaya*, e a indução de alterações no fuso mitótico, para todos os extratos testados. Estudos anteriores com as mesmas espécies mostraram que *A. indica*, *M. indica*, *C. citratus* e *M. lucida* contém zinco, magnésio, cobre, ferro, cádmio e chumbo, em diferentes concentrações (AL-MOARUF et al., 2004; HAIDER et al., 2004) e estas substâncias já foram relacionadas à inibição do crescimento das raízes de cebola, pepino, alface e milho (GORSUCH et al., 1995; WANG, 1987). Já

as alterações do fuso foram atribuídas à presença de alcaloides, taninos, saponinas, antraquinonas e glicosídeos (FASOLA e EGUNYOMI, 2005).

Belcavello et al. (2012) trabalhando com *Zornia diphylla* (L.) Pers avaliaram o potencial citotóxico, aneugênico e mutagênico do extrato hidroalcoólico da espécie (EHZD) sobre células meristemáticas de cebola (*A. cepa*) e da medula óssea de ratos *Wistar*. A planta é conhecida como arrozinho-do-campo e é muito utilizada na medicina popular brasileira nas formas de infusão e decocto para o tratamento de febre, congestão, inchaço e reumatismo (REN et al., 2012). Os autores verificaram efeito tóxico sobre a germinação das sementes, em função da concentração administrada, sendo o baixo índice de germinação um indicativo de toxidez do extrato. Além disso, o extrato apresentou efeito mutagênico significativo para a concentração de 3 mg/mL, quando comparado ao controle negativo (água destilada). Assim, os efeitos observados no ensaio de *A. cepa* mostraram que o EHZD provoca danos ao material genético e tende a aumentar de acordo com a concentração utilizada e com o tempo de exposição das células.

Sperotto (2012) avaliou as propriedades citotóxicas e mutagênicas do óleo de *Piper gaudichaudianum* (jaborandi) e do seu componente majoritário (nerolidol), utilizando diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados mostraram que tanto o óleo quanto o nerolidol foram capazes de induzir citotoxicidade de forma dependente da dose. No entanto, em relação ao ensaio mutagênico, apenas o óleo induziu efeito significativo para a linhagem XV185-14c, enquanto o componente isolado não apresentou mutagenicidade.

Fão et al. (2012) relataram que o extrato da seiva da casca de *Croton lechleri* (Euphorbiaceae) popularmente conhecida como sangue-de-dragão induziu um alto índice de micronúcleos em células meristemáticas de *Allium cepa*, o que evidencia o potencial mutagênico desta espécie e a necessidade de estudos mais aprofundados que permitam avaliar a relação riscos-benefícios do uso da planta a longo prazo. A espécie produz látex rico no alcaloide taspina, conhecido por sua ação antiinflamatória, analgésica e cicatrizante.

Akintonwa et al. (2009) realizaram um estudo detalhado sobre os efeitos das plantas medicinais mais utilizadas na Nigéria, através do teste de Ames e do sistema de teste de *Allium cepa*. As plantas testadas foram *Morinda lucida*, *Azadirachta indica*, *Terapluera tetraptera*, *Plumbago zeylanica*, *Xylopia aethiopica*, *Newbouldia*

laevis, *Alstonia boonei*, *Enantia chlorantha* e *Rauvolfia vomitoria*. Os resultados indicaram inibição do crescimento radicular e diminuição do índice mitótico de células de cebola, de acordo com a elevação das doses do extrato. Além disso, todas as concentrações testadas induziram algum tipo de alteração cromossômica, tais como formação de pontes e fragmentos, c-metáfase e anáfases com cromossomos atrasados. De acordo com os autores, as alterações observadas são resultado dos efeitos dos extratos testados sobre a formação do fuso mitótico, resultando em distúrbios do ciclo celular. O teste de Ames indicou mutagenicidade para as espécies *Azadirachta indica*, *Morinda lucida* e *Enantia chlorantha* (AKINTONWA et al., 2009).

Metin e Burun (2010) avaliaram o efeito de extratos de *Urginea maritima*, uma planta medicinal que também é empregada como pesticida, em células de *Allium cepa*. Os resultados mostraram a ocorrência de alterações cromossômicas para todas as concentrações do extrato analisadas e foi possível observar elevação do percentual de alterações cromossômicas de acordo com a elevação da concentração do extrato. Além disso, houve diminuição significativa dos índices mitóticos quando comparados ao controle negativo.

Efeitos tóxicos e/ou genotóxicos também já foram relatados para as espécies medicinais *Malpighia glabra* L. (acerola) (DUSMAN et al., 2012), *Helicrysum plicatum* (EROGLU et al., 2010), *Passiflora alata* (maracujá doce) (BOEIRA et al., 2010), *Crotun caudatus* (LEISHANGTHEM e THOUNAOJAM, 2011), *Linaria genstifolia* (LIMAN et al., 2012), *Nauclea latifolia* (LIU et al., 2011) e *Jasminun officinale* L. (jasmim) (TEERARAK et al., 2010).

Como pode ser observado, diversas plantas com uso consagrado pela medicina popular apresentam efeitos tóxicos e/ou genotóxicos e, por isso, seu uso deve ser feito com cautela. Segundo Júnior et al. (2012), pode-se dizer que toda substância é um agente tóxico em potencial, dependendo das condições de exposição, como a dose administrada e absorvida, do tempo e da frequência de administração (CASTRO, 1993). Dessa forma, a utilização de extratos, infusos, decoctos e óleos vegetais, com finalidade terapêutica, deve ser precedida da avaliação de seus efeitos tóxicos e genotóxicos sobre as células (JÚNIOR et al., 2012). É importante ressaltar que resultados provenientes de bioensaios genéticos são relevantes à saúde humana, uma vez que o alvo toxicológico das substâncias

testadas é o DNA (HOUK, 1992), presente em todas as formas vivas. Sugere-se, portanto, que substâncias que reagem de alguma forma com o DNA da espécie testada apresentam potencial para desencadear efeitos semelhantes em outras espécies e até mesmo no homem (HOUK, 1992; MENEGUETTI et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos citogenotóxicos de extratos radiculares de *Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen, visando contribuir com a segurança do uso dessa espécie.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar os efeitos citogenotóxicos de extratos metanólico e aquoso, produzidos a partir das raízes de *Pfaffia glomerata*;
- 2) Avaliar quimicamente o extrato metanólico de *P. glomerata*, quanto ao teor de β -ecdisona;
- 3) Avaliar os efeitos citogenotóxicos da β -ecdisona isolada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

O material de *Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen utilizado no presente trabalho foi gentilmente cedido a partir do Banco de Germoplasma da referida espécie, localizado na Universidade Federal de Viçosa-MG, sob coordenação do Prof. Dr. Wagner Campos Otoni. Este foi mantido tanto *in vitro* quanto *in vivo* no Laboratório de Genética e Biotecnologia e na Estação Experimental de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora-MG, para a condução dos experimentos.

4.2 MODELO DE ESTUDO

Para os ensaios de citogenotoxicidade realizados neste trabalho foram utilizadas sementes de *Allium cepa* L. (FELTRIN[®], Lote 0003801210000140, variedade Baia Periforme). Os experimentos foram conduzidos durante o ano de 2012, com sementes com data de validade até 06/2014.

4.3 PREPARO DOS EXTRATOS E SOLUÇÕES DE β -ECDISONA

4.3.1 EXTRATO METANÓLICO

Para o preparo do extrato metanólico, foram coletadas raízes de plantas adultas (Figura 2). Estas permaneceram sob cultivo por 4 a 8 meses, em vasos plásticos contendo substrato Plantmax[®], sendo os mesmos mantidos na Estação Experimental de Cultivo e Manutenção de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora-MG.

Imediatamente após a coleta, as raízes foram lavadas em água corrente, com o auxílio de uma escova de cerdas macias, para retirada do substrato. O peso fresco das raízes foi registrado, para comparação posterior com o peso seco. As raízes foram cuidadosamente reduzidas a fragmentos cilíndricos com o auxílio de um bisturi e mantidas em estufa a 45°C, até a estabilização do peso seco (aproximadamente sete dias).

A metodologia de extração foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Silva (2008), com adaptações. As raízes secas foram esmagadas com o auxílio de um pistilo e a extração foi realizada por maceração estática com metanol (10% *p/v*), em temperatura ambiente, até exaustão. O extrato obtido foi filtrado e concentrado, através de rotaevaporação, a 45°C (Büchi Rotavapor R-114). Durante o processo de extração, os frascos permaneceram protegidos da luz, com o objetivo de prevenir a degradação dos compostos.

Após a rotaevaporação, o extrato pronto foi armazenado em vidro âmbar previamente pesado, e permaneceu em dessecador contendo sílica, para a total retirada do solvente (metanol) durante uma semana. O vidro foi então novamente pesado para determinação do rendimento (resíduo) obtido e armazenado em geladeira para posterior diluição e análise química.

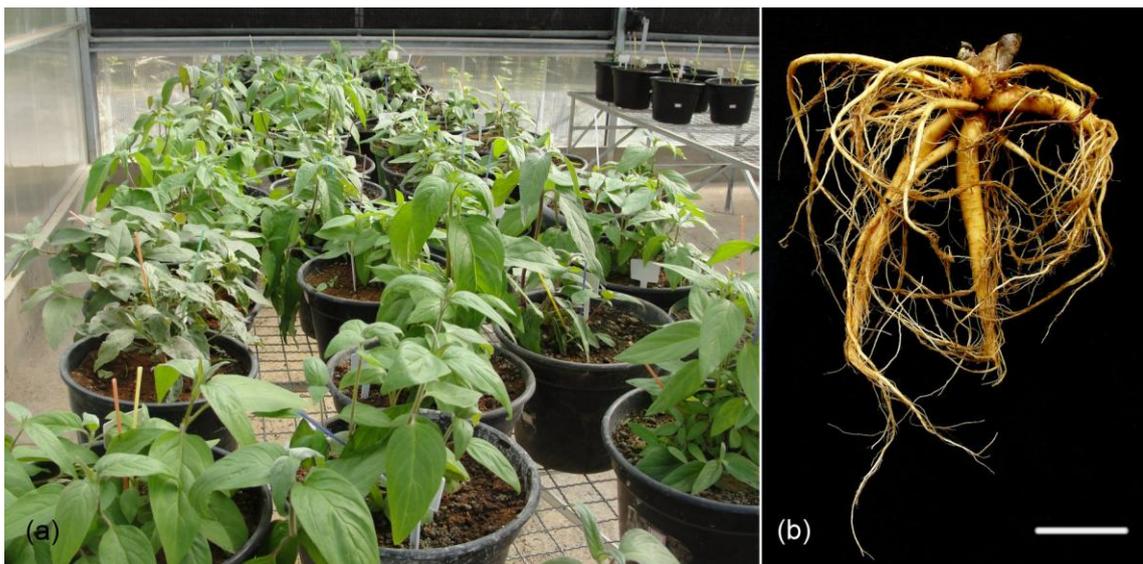


Figura 2. (a) *Pfaffia glomerata* cultivada em casa de vegetação e (b) Raiz de *Pfaffia glomerata*. Barra = 5 cm.

O extrato metanólico foi diluído em 13 diferentes concentrações (em água destilada): 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256mg/mL. Estas concentrações foram utilizadas nos ensaios de germinação e crescimento radicular.

4.3.2 SOLUÇÕES DE β -ECDISONA

Para a realização dos ensaios de germinação e crescimento radicular e de citogenotoxicidade, 12 diferentes concentrações de β -ecdisona foram preparadas (diluídas em água destilada): 0,0011, 0,0023; 0,0046; 0,0093; 0,0187; 0,0375; 0,075; 0,15; 0,30; 0,60; 1,20; 2,40 mg/mL. Para este objetivo foi utilizada a β -ecdisona comercial (CAS 5289-74-7, Sigma Aldrich-Brasil).

4.3.3 EXTRATO AQUOSO

Para o preparo do extrato aquoso, a raiz de um indivíduo de *P. glomerata* com um ano de cultivo foi coletada e imediatamente lavada em água corrente, com o auxílio de uma escova de cerdas macias, para a total retirada do substrato. Posteriormente, 10g de raízes foram reduzidas a fragmentos cilíndricos com o auxílio de uma lâmina de bisturi e submetidas à decocção, em água fervente (1L), por 20 minutos. O extrato aquoso obtido (10g/L) foi filtrado em papel filtro e armazenado em geladeira para utilização nos ensaios de germinação e crescimento radicular, descritos adiante. A quantidade, em gramas, de raiz utilizada foi determinada de acordo com a quantidade normalmente utilizada pela população (TESKE, 2001; MONTEIRO et al., 2012).

4.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

Para o extrato aquoso empregado nos experimentos aqui descritos não foram realizadas caracterizações químicas. Para o extrato metanólico, foi avaliado o teor do ecdisteroide β -ecdisona, de acordo com a metodologia apresentada a seguir.

4.4.1 TEOR DE β -ECDISONA

A quantificação do teor de β -ecdisona presente no extrato metanólico do acesso utilizado na condução destes experimentos (acesso 46) foi realizada empregando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com o aparelho SCL-10 AVP (Shimadzu, Japão). O sistema cromatográfico era composto por degazeificador DG14-14A, bomba quaternária FCV-10 ALVP e LC-10ATVP, auto-injetor SIL-10AF, detector diodo e array SPD-MP10 AVP.

Como substância química de referência (SQR), utilizou-se o padrão comercial de β -ecdisona (CAS 5289-74-7, Sigma Aldrich-Brasil), com pureza de 94%. Empregou-se uma coluna ACE C18 (5,0 μ m x 4,6mm x 150mm) e fase móvel de acetonitrila:água (16:84 v/v), com fluxo de 1,2mL.min⁻¹. As leituras foram feitas em duplicata, em temperatura ambiente, de acordo com o protocolo desenvolvido no NIQUA – Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica da Universidade Federal de Juiz de Fora-MG. A solução de β -ecdisona e as amostras do extrato foram diluídas em fase móvel, a fim de se obter uma concentração de 1mg/mL, em balão volumétrico, até a completa homogeneização. Posteriormente, as amostras foram filtradas em membrana com 0,45 μ m de porosidade. O tempo de corrida foi de 10 minutos e o comprimento de onda de 248 nm. Foram injetados 20 μ L de cada amostra no aparelho.

O teor de β -ecdisona foi determinado através da área do pico gerado pela substância química de referência, comparada com a área do pico das amostras, conforme a equação:

$$\text{Teor} = \frac{\text{Área do pico da amostra}}{\text{Área do pico do padrão}} \times \frac{[\text{Padrão}]}{[\text{Amostra}]} \times \text{Pt\%},$$

onde Pt% = pureza do padrão, em percentual.

As concentrações de β -ecdisona encontradas em cada diluição do extrato foram calculadas como a seguir:

$$[\beta\text{-ecdisona por extrato}] = \frac{\text{Percentual de } \beta\text{-ecdisona}}{\text{no extrato bruto}} \times \text{Concentração do extrato}$$

4.5 ENSAIOS DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO RADICULAR PARA ESCOLHA DAS CONCENTRAÇÕES TESTADAS NOS ENSAIOS DE CITOGENOTOXIDADE

Para a escolha dos tratamentos empregados na análise de citogenotoxicidade foi realizado um ensaio de germinação e crescimento radicular utilizando-se sementes de *Allium cepa*. Neste ensaio foram empregadas 13 diferentes concentrações do extrato metanólico de *P. glomerata*, 12 diferentes concentrações de β -ecdisona, uma concentração do extrato aquoso de *P. glomerata*, além dos controles positivo (metil metano sulfonato – MMS; 4×10^{-4} M) e negativo (água destilada).

Para os testes de germinação aqui descritos, as sementes foram dispostas em placas de Petri pequenas (6cm), forradas com papel filtro umedecido com as diferentes concentrações dos extratos (800 μ L por placa), além dos controles. O experimento foi composto de três repetições (placas) para cada tratamento, cada placa contendo 10 sementes de *Allium cepa* (sem pré-germinação). O experimento teve duração de oito dias, sendo que a cada 24 horas foi feita a contagem de sementes germinadas e a medição das raízes. As soluções (extratos e controles) foram renovadas diariamente, através da substituição do papel filtro e adição de

800µL por placa. Durante todo o período do experimento, as placas permaneceram em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de $40 \mu\text{moles.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas.

4.6 ENSAIOS DE CITOGENOTOXIDADE

Com base nos ensaios descritos no item 4.5, seis diferentes concentrações do extrato metanólico (8, 16, 32, 64, 128 e 256mg/mL) denominadas de T1 até T6, duas concentrações de β -ecdisona (0,15 e 2,40mg/mL) e uma concentração do extrato aquoso (10g/L) foram utilizadas nos experimentos de citogenotoxicidade. Adicionalmente, foram utilizados dois controles: negativo (água destilada) e positivo (MMS, $4 \times 10^{-4}\text{M}$).

Nos experimentos de citogenotoxicidade, as sementes de *Allium cepa* foram primeiramente submetidas à pré-germinação em placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada, até que as raízes atingissem aproximadamente 1,0cm de comprimento. As raízes foram então submetidas aos tratamentos por diferentes períodos de exposição (24h, 48h e 72h). Para os experimentos foi utilizado um delineamento inteiramente ao acaso, composto de 3 repetições. Pelo menos de 3 a 9 lâminas foram analisadas em cada tratamento, dispostas dentro destas repetições. Após a exposição, as raízes foram coletadas, lavadas e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol:ácido acético v/v). Após 24h, a solução fixadora foi renovada e as raízes foram armazenadas a 4°C .

As lâminas foram preparadas utilizando-se a técnica de esmagamento, de acordo com LEME e MARIN-MORALES (2008), com adaptações. As raízes foram lavadas em água destilada por 5 minutos, hidrolisadas em HCl 5N por 20 minutos em temperatura ambiente e lavadas novamente por 5 minutos em água destilada. A região meristemática das raízes foi separada, com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sobreposta por uma lamínula e esmagada cuidadosamente em uma gota de ácido acético 45%. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e coradas

com Giemsa 5%, durante quatro minutos, na ausência de luz. Os seguintes parâmetros foram analisados:

a) ÍNDICE MITÓTICO (Percentual de células em divisão): O Índice Mitótico (IM) foi calculado utilizando-se a equação: $IM = NCD/NTC \times 100$, em que NCD corresponde ao número de células em divisão e NTC ao número total de células analisadas. Foram analisadas, no mínimo, 1000 células por lâmina (ALVIM et al., 2011).

b) ÍNDICES DE FASES (Percentuais de células em cada uma das fases da mitose): Os Índices de Fases (IFs) (Profásico-IPr; Metafásico-IMe; Anafásico-IAn e Telofásico-ITe) foram calculados utilizando-se a equação: $IFs = NCF/NTCD$, em que NCF corresponde ao número de células na respectiva fase da divisão (prófase, metáfase, anáfase ou telófase) e NTCD ao número total de células em divisão analisadas (ALVIM et al., 2011).

c) PERCENTUAIS DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS (Ac): As seguintes alterações cromossômicas foram investigadas e quantificadas: formação de brotos e micronúcleos, quebras e perdas cromossômicas, formação de pontes, multipolaridade, aderência cromossômica, migração tardia, alinhamento tardio e c-metáfase (ALVIM et al., 2011).

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram avaliados através da Análise de Variância (ANOVA) e do teste de Dunnett, com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

5.1.1 TEOR DE β -ECDISONA

Nas condições cromatográficas empregadas, o tempo médio de retenção para o padrão de β -ecdisona foi de 1,23 minutos e a área do pico de 4118976,5 mA (Figura 3a). Para a amostra do extrato metanólico, o tempo de retenção foi o mesmo encontrado para a substância de referência e a área do pico do cromatograma foi de 365705,5 mA (Figura 3b).

Sendo assim, uma vez que a pureza do padrão utilizado nesta análise é igual a 94% (Sigma Aldrich, Brasil), o teor de β -ecdisona encontrado para o extrato metanólico utilizado nestes ensaios foi igual a 1,93%, como demonstrado a seguir:

$$\text{Teor} = \frac{365705,5}{4118976,5} \times \frac{176}{790} \times 94\% = 1,93\%$$

Este valor é referente ao teor do metabólito presente no extrato seco. Considerando o rendimento do extrato (de acordo com o peso seco de raiz utilizado), o teor de β -ecdisona presente na raiz do acesso de *P. glomerata* utilizado é igual a 0,34%.

Com o teor de β -ecdisona do extrato bruto foi possível calcular a quantidade de β -ecdisona nas diferentes concentrações que foram utilizadas nos ensaios de citogenotoxicidade, como demonstrado a seguir, na Tabela 3.

As concentrações de 0,15mg/mL de β -ecdisona (correspondente à concentração de 8mg/mL do extrato metanólico) e de 2,40mg/mL (correspondente à concentração de 128mg/mL do extrato metanólico) foram escolhidas para a condução de um experimento adicional de citogenotoxicidade, por representarem o

tratamento a partir do qual a maioria dos efeitos significativos foram observados nos ensaios de germinação e crescimento radicular (8mg/mL, T1) e a concentração próxima a comumente encontrada em produtos comerciais (128mg/mL, T5).

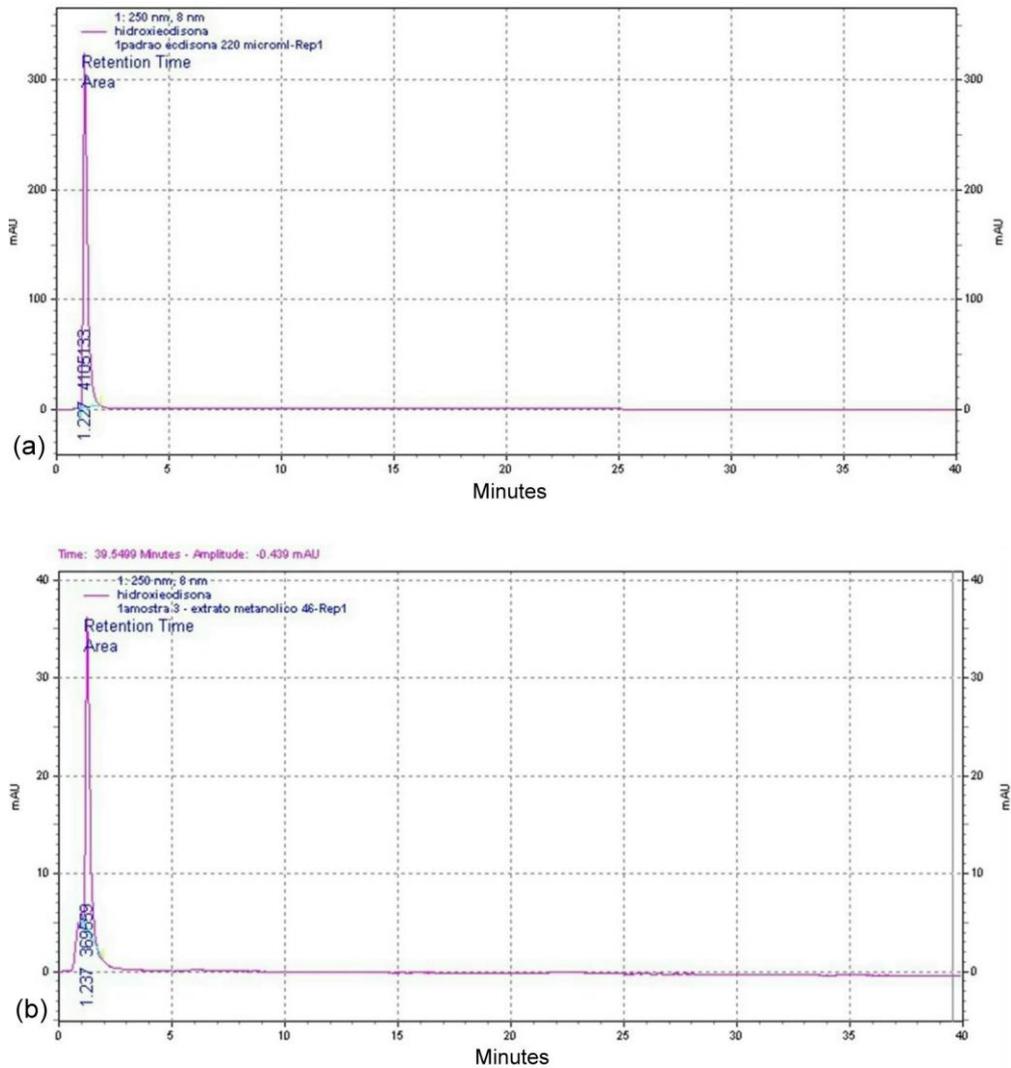


Figura 3. Cromatogramas obtidos por HPLC para o padrão de β -ecdisona (a) e para a amostra do extrato metanólico de *P. glomerata* na concentração de 1mg/mL (b).

Tabela 3. Concentrações de β -ecdisona encontradas em cada extrato metanólico utilizado nos ensaios de citogenotoxicidade.

Tratamento	Concentração do extrato	Quantidade de β -ecdisona (X 1,93%)
T1	8mg/mL	0,15mg/mL
T2	16mg/mL	0,30mg/mL
T3	32mg/mL	0,60mg/mL
T4	64mg/mL	1,20mg/mL
T5	128mg/mL	2,40mg/mL
T6	256mg/ml	4,80mg/mL

5.2 ENSAIOS DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO RADICULAR PARA ESCOLHA DAS CONCENTRAÇÕES TESTADAS

Através da Figura 4 é possível perceber os efeitos do extrato metanólico das raízes de *P. glomerata*. Para as concentrações entre 0,0625 e 4 mg/mL (Figuras não mostradas) não foram observados efeitos sobre a germinação e crescimento radicular e estas concentrações foram descartadas dos experimentos posteriores. Redução no crescimento radicular foi observada somente a partir da concentração de 8mg/mL (T1) (Figura 4c), sendo que esta concentração e o tratamento de 16mg/mL (T2) não interferiram na taxa de germinação. Para o tratamento de 32mg/mL (T3) (Figura 4d) poucas sementes germinaram em comparação com o controle negativo (CN) (Figura 4a). Em média, esta inibição foi de aproximadamente 60%. Com relação ao crescimento radicular, nesta concentração, as raízes também se mostraram acentuadamente menores em relação às raízes do controle negativo (Figura 4d em comparação com a Figura 4a). Para todos os tratamentos com concentrações iguais ou superiores a 64 mg/mL (T4 até T6) (Figura 4e), foi observada completa inibição da germinação.

O mesmo ensaio de germinação foi realizado com as concentrações de β -ecdisona correspondentes às encontradas em cada diluição do extrato metanólico (Tabela 3). Nenhum efeito sobre a germinação ou crescimento radicular foi observado para todas as concentrações testadas (Figura 4f).

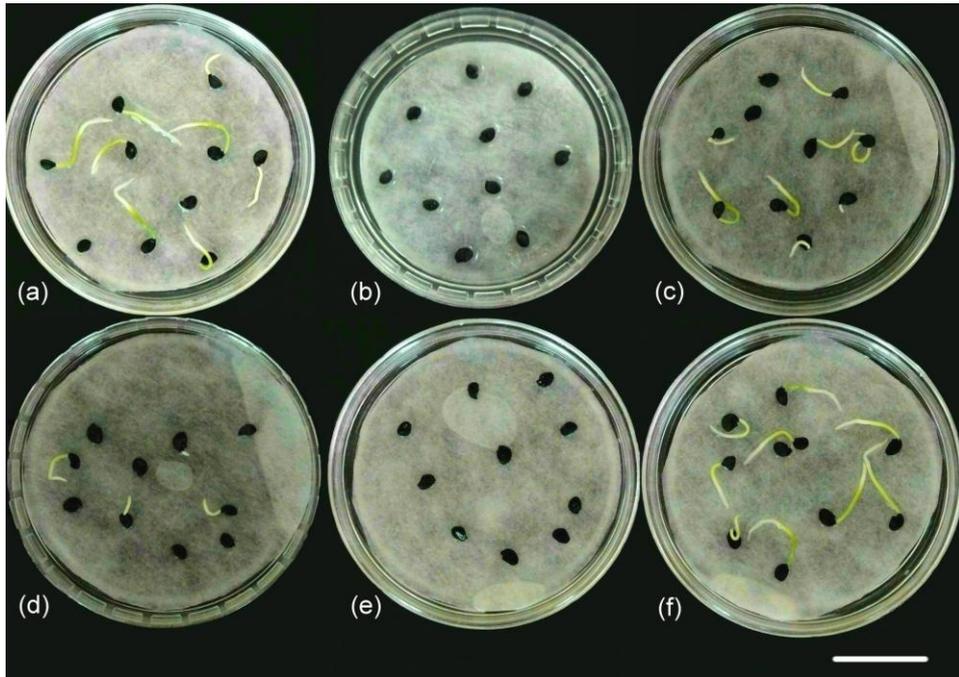


Figura 4. Ensaios de germinação e crescimento radicular em *Allium cepa* após exposição ao extrato metanólico de *P. glomerata*. (a) Controle negativo (CN); (b) Controle positivo (CP); (c) 8mg/mL (T1); (d) 32 mg/mL (T3); (e) 64 mg/mL (T4) e (f) 2,40 mg/mL de β -ecdisona. As fotos foram tiradas no 5º dia de exposição. Barra = 2cm.

5.3 ENSAIOS DE CITOGENOTOXIDADE

5.3.1 EXTRATO METANÓLICO

Os resultados obtidos na análise de ciclo celular após exposição ao extrato metanólico de *P. glomerata* são mostrados na Figura 5.

Tanto em 24h quanto em 48h de exposição, foi observada diminuição do índice mitótico, de acordo com o aumento das concentrações do extrato (Figuras 5a e 5b).

Para as análises de 24h de exposição, foi possível observar inibição significativa do índice mitótico a partir da concentração de 16mg/mL (T2) (Dunnett, $p < 0,05$) (Figura 5a). Neste tratamento, a redução do percentual de células em divisão correspondeu a 32,41% em comparação com o controle negativo (CN).

Já em 48h, foi observada inibição significativa do índice mitótico a partir do tratamento T4 (64mg/mL) (Dunnett, $p < 0,05$), sendo esta redução de 35,48% em relação ao controle negativo (CN) (Figura 5b). Quando se analisa a maior

concentração testada (256 mg/mL, T6), a inibição do índice mitótico foi respectivamente de 72,22% e 74,19% para as exposições de 24 e 48h (comparando-se com o controle negativo) (Figuras 5a e 5b).

Em comparação com o controle positivo (CP) em 24h de exposição, os tratamentos iguais ou acima de 64mg/mL (T4, T5 e T6) demonstraram índices mitóticos iguais ou inferiores. Já para 48h, apenas o tratamento de 256mg/mL (T6) apresentou um índice mitótico inferior ao controle positivo (Figuras 5a e 5b).

Considerando a análise dos índices de fases (profásico, metafásico, anafásico e telofásico), observa-se efeito significativo para o índice profásico para a maioria dos tratamentos com o extrato metanólico (Dunnett, $p < 0,05$) (Figuras 5c e 5d). Em 24h de exposição ao extrato, as concentrações acima de 32mg/mL (T3) (incluindo esta), aumentaram significativamente o percentual de células em prófase (Dunnett, $p < 0,05$) (Figura 5c). O mesmo efeito foi observado para os tratamentos de 128 (T5) e 256 (T6) mg/mL após 48h de exposição (Figura 5d). Para todos os tratamentos com efeitos significativos para índices profásicos, um aumento médio de 35,57% foi observado em comparação ao controle negativo (Figuras 5c e 5d). Tanto em 24h quanto em 48h de exposição ao extrato metanólico, os aumentos nos índices profásicos são estatisticamente iguais aos aumentos induzidos pelo controle positivo (Dunnett, $p < 0,05$) (Figuras 5c e 5d).

Para a maioria dos tratamentos, os índices metafásicos observados foram semelhantes aos encontrados para o controle negativo. No período de exposição de 24h, apenas o tratamento de 16mg/mL (T2) aumentou significativamente o percentual de células em metáfase (Figura 5e). Já em 48h, o mesmo comportamento foi registrado após exposição ao tratamento de 32mg/mL (T3) (Dunnett, $p < 0,05$) (Figura 5f). Para estes mesmos tratamentos (T2: 16mg/mL e T3: 32mg/mL) também foram observados aumentos significativos dos índices telofásicos (Figuras 5i e 5j), respectivamente após 24 e 48h de exposição, semelhante ao descrito anteriormente para os índices metafásicos (Dunnett, $p < 0,05$). Para algumas concentrações, foi observada diminuição significativa dos índices.

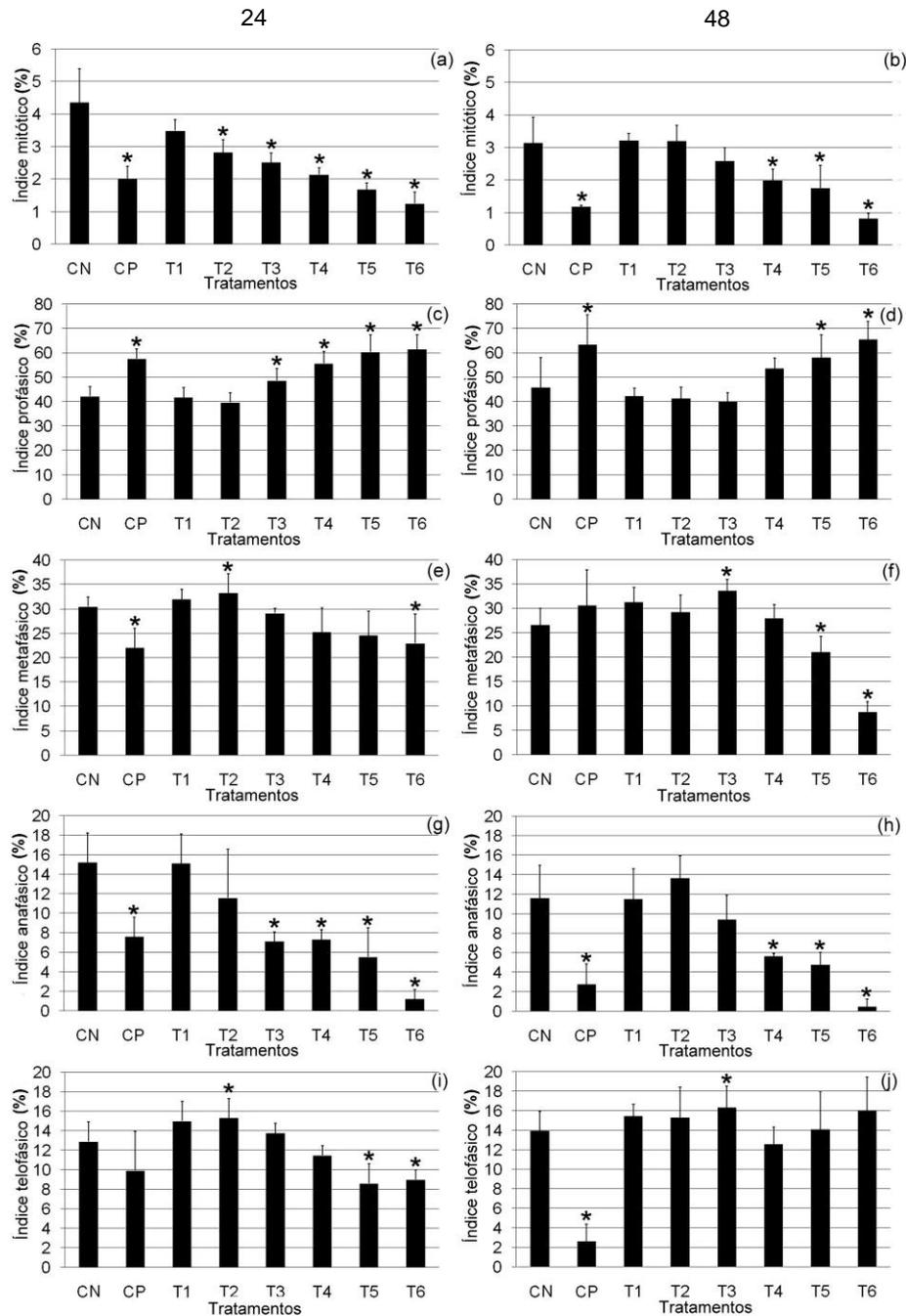


Figura 5. Análise de ciclo celular após exposição ao extrato metanólico de *P. glomerata*. (a, c, e, g, i) respectivamente representam os índices: mitótico, profásico, metafásico, anafásico e telofásico após exposição das células meristemáticas de *Allium cepa* ao extrato metanólico de *P. glomerata* por 24h; (b, d, f, h, j) respectivamente representam os índices: mitótico, profásico, metafásico, anafásico e telofásico após exposição das células meristemáticas de *Allium cepa* ao extrato metanólico de *P. glomerata* por 48h. CN = Controle negativo (água destilada); CP = Controle positivo (MMS 4×10^{-4} M); T1 = 8 mg/mL; T2 = 16mg/mL; T3 = 32mg/mL; T4 = 64 mg/mL; T5 = 128 mg/mL e T6 = 256 mg/mL. As médias seguidas por um (*) são estatisticamente diferentes do controle negativo (Dunnett, $p < 0,05$).

Os resultados da análise de indução de alterações celulares e cromossômicas pelo extrato metanólico são mostrados na Tabela 4. Quando avalia-se o percentual total de alterações celulares/cromossômicas, todos os tratamentos (exceto o tratamento de 256mg/mL (T6) após 24h de exposição) induziram um aumento significativo em relação ao controle negativo, tanto em 24h quanto em 48h de exposição (Dunnett, $p < 0,05$) (Tabela 4). Considerando-se o controle negativo como comparação, o tratamento de 128mg/mL (T5), após 24h de exposição, aumentou em 2,99 vezes o percentual de células portadoras de alterações (Dunnett, $p < 0,05$), sendo o percentual de alterações deste tratamento não significativo em relação àquele encontrado para o controle positivo (Dunnett, $p < 0,05$) (Tabela 4). Este mesmo tratamento (128 mg/mL, T5), também induziu o maior percentual de alterações celulares/cromossômicas após exposição por 48h. Nesta condição, este percentual foi 7,13 vezes maior do que aquele observado no controle negativo (Dunnett, $p < 0,05$) e também significativamente maior do que o percentual de alterações induzido pelo controle positivo (1,36x) (Dunnett, $p < 0,05$) (Tabela 4).

De modo geral, considerando as alterações individuais, os efeitos significativos em relação ao controle negativo foram observados já para o tratamento de 8mg/mL (T1) (Tabela 4). Com 24h de exposição, este tratamento induziu um aumento significativo no percentual de cromossomos aderentes (2,83 vezes maior do que o controle negativo), perda cromossômica (3,27 vezes) e migração tardia (5,51 vezes) (Dunnett, $p < 0,05$) (Tabela 4). Já com 48h de exposição, todas as alterações (exceto c-metáfase e fragmentos cromossômicos) mostraram percentuais significativamente aumentados em relação ao controle negativo após exposição ao tratamento de 8mg/mL (T1) (Dunnett, $p < 0,05$) (Tabela 4). Os maiores percentuais de alterações cromossômicas foram observados para as maiores concentrações (64mg/mL (T4), 128mg/mL (T5) e 256mg/mL (T6), em um efeito dependente da dose. Todos estes percentuais foram observados após 48h de exposição, em um efeito dependente do tempo (Tabela 4).

Em comparação com o controle negativo estes percentuais foram: para cromossomos aderentes (aumento de 47,54% após exposição ao tratamento de 64mg/mL-T4); para c-metáfase (aumento de 15,09% após exposição ao tratamento de 256mg/mL-T6); para perda cromossômica (aumento de 9,93% após exposição ao tratamento de 128mg/mL-T5); para fragmentos cromossômicos (aumento de 1,57%

após exposição ao tratamento de 256mg/mL-T6); para ponte (aumento de 15,97% após exposição ao tratamento de 128mg/mL-T5); para migração tardia (aumento de 11,27% após exposição ao tratamento de 128mg/mL-T5); para anáfase multipolar (aumento de 6,90% após exposição ao tratamento de 128mg/mL-T5).

Tabela 4. Percentual de alterações cromossômicas após exposição ao extrato metanólico de *Pfaffia glomerata*.

Tratamentos	Percentual total de alterações	Cromossomos Aderentes	c-metáfase	Perda cromossômica	Fragmentos	Ponte	Migração tardia	Anáfase multipolar
24h de exposição								
Controle negativo	9,32 ^b	8,36 ^b	2,31	2,32 ^b	0,21	4,12	1,23 ^b	2,94 ^b
Controle positivo	28,34 ^a	29,55 ^a	4,55	6,12 ^a	0,68	5,41	10,34 ^a	6,76 ^a
8mg/mL (T1)	17,11 ^{ab}	23,68 ^a	2,37	7,60 ^a	0	6,21	6,78 ^{ab}	4,11
16mg/mL (T2)	18,78 ^{ab}	26,89 ^a	6,72 ^a	6,42 ^a	0,32	6,33 ^a	8,75 ^a	3,45 ^b
32mg/mL (T3)	21,34 ^{ab}	36,27 ^{ab}	5,76 ^a	5,79 ^a	0,28	9,52 ^{ab}	9,87 ^a	5,26 ^a
64mg/mL (T4)	19,34 ^{ab}	40,65 ^{ab}	6,25 ^a	5,28 ^a	0	14,21 ^a	9,75 ^a	6,23 ^a
128mg/mL (T5)	27,89 ^a	32,86 ^a	7,51 ^a	6,65 ^a	0	13,26 ^a	10,11 ^a	7,80 ^a
256mg/mL (T6)	14,32 ^b	31,37 ^a	12,75 ^{ab}	7,90 ^a	0	7,14 ^a	4,56 ^{ab}	2,31 ^b
48h de exposição								
Controle negativo	7,18 ^b	12,11 ^b	0	2,57 ^b	0	3,81	0,96	0
Controle positivo	37,65 ^a	33,67 ^a	0	7,50 ^a	0	9,09 ^a	9,11 ^a	9,09 ^a
8mg/mL (T1)	34,12 ^a	49,87 ^{ab}	0,62	7,13 ^a	0,45	6,66 ^a	7,11 ^a	2,36 ^a
16mg/mL (T2)	39,23 ^a	47,65 ^{ab}	2,10 ^{ab}	7,24 ^a	0,27	10,34 ^a	7,83 ^a	3,45 ^a
32mg/mL (T3)	42,32 ^{ab}	55,79 ^{ab}	2,78 ^{ab}	8,33 ^a	0,67	18,38 ^a	9,30 ^a	0
64mg/mL (T4)	47,89 ^{ab}	59,65 ^{ab}	2,12 ^{ab}	9,52 ^{ab}	0,60	17,78 ^a	11,23 ^a	6,67 ^a
128mg/mL (T5)	51,24 ^{ab}	45,66 ^{ab}	7,63 ^{ab}	12,50 ^{ab}	1,25 ^{ab}	19,78 ^a	12,23 ^a	6,90 ^a
256mg/mL (T6)	32,23 ^a	37,74 ^{ab}	15,09 ^{ab}	1,47	1,47 ^{ab}	13,33 ^a	6,67 ^a	1,34 ^a

As médias seguidas pelas letras a e b são estatisticamente diferentes dos controles negativo e positivo, respectivamente (Dunnnett, $p < 0,05$).

A análise adicional do percentual de micronúcleos também demonstrou um efeito citogenotóxico do extrato metanólico de *P. glomerata* (Figura 6). Tanto em 24h, quanto em 48h de exposição, todos os tratamentos demonstraram efeitos significativos em aumentar o percentual de micronúcleos (Dunnett, $p < 0,05$) (Figura 6).

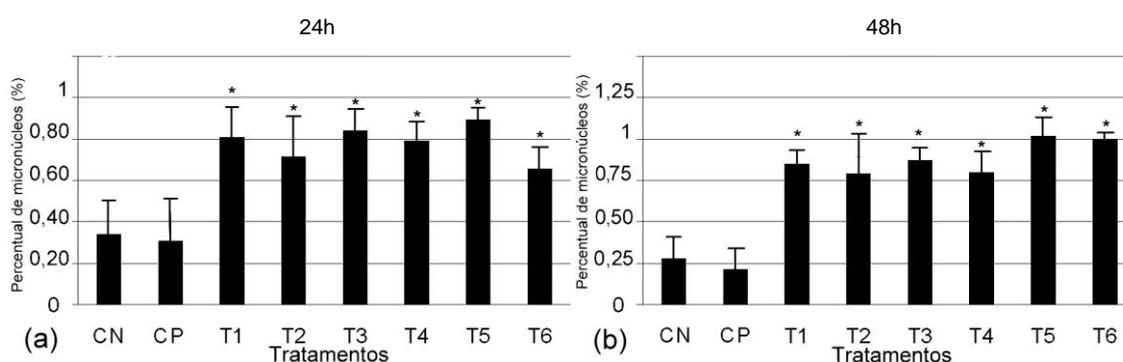


Figura 6. Percentual de micronúcleos após exposição ao extrato metanólico de *P. glomerata*. (a) após 24h de exposição e (b) após 48h de exposição. CN = Controle negativo (água destilada); CP = Controle positivo (MMS $4 \times 10^{-4}M$); T1 = 8 mg/mL; T2 = 16mg/mL; T3 = 32mg/mL; T4 = 64 mg/mL; T5 = 128 mg/mL e T6 = 256 mg/mL. As médias seguidas por um (*) são estatisticamente diferentes do controle negativo (Dunnett, $p < 0,05$).

5.3.2 β -ECDISONA

Os resultados obtidos na análise de ciclo celular após exposição às concentrações de β -ecdisona são mostrados na Figura 7. Diminuição do índice mitótico foi observada somente após 48h de exposição à concentração de 2,40mg/mL de β -ecdisona (Dunnett, $p < 0,05$) (Figura 7).

Em comparação com o controle negativo, esta redução foi de 34,37%. Entretanto, em relação ao controle positivo, o percentual de células em divisão observado para este tratamento (2,40mg/mL de β -ecdisona) foi maior (Figura 7). De modo geral, os tratamentos com β -ecdisona induziram também um aumento significativo nos percentuais de células em metáfase (Figura 7). Considerando a maior concentração de β -ecdisona (2,40mg/mL), este

percentual foi 1,26x maior do que o do controle negativo após 24h de exposição e 1,1x maior após 48h de exposição (Figura 7).

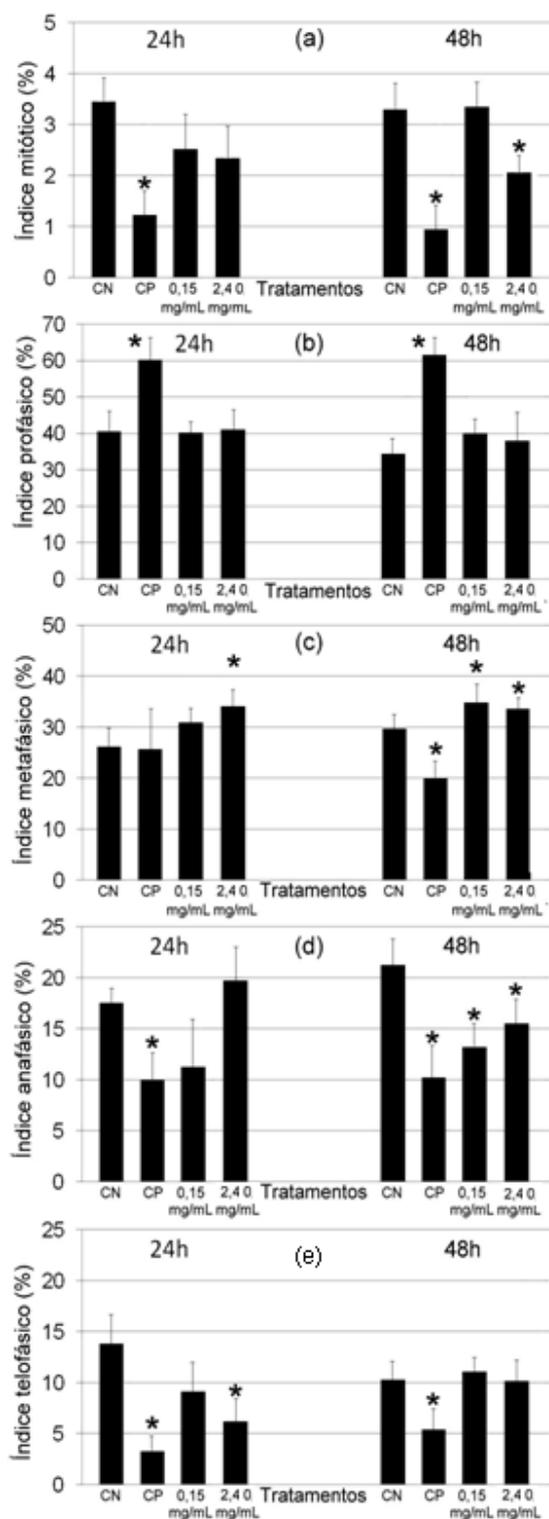


Figura 7 Análise de ciclo celular após exposição às concentrações de β -ecdisona. (a, b, c, d, e), respectivamente representam os índices: mitótico, profásico, metafásico, anafásico e telofásico após exposição das células meristemáticas de *Allium cepa* às concentrações de β -ecdisona por 24h (esquerda) e 48h (direita). CN = Controle negativo (água destilada); CP = Controle positivo (MMS 4×10^{-4} M). As médias seguidas por um (*) são estatisticamente diferentes do controle negativo (Dunnett, $p < 0,05$).

Os resultados da análise de indução de alterações celulares e cromossômicas após a exposição às concentrações de β -ecdisona são mostrados na Tabela 5.

Tanto em 24h de exposição quanto em 48h, as concentrações de β -ecdisona avaliadas induziram um aumento significativo (Dunnett, $p < 0,05$) no percentual total de alterações (Tabela 5). Em média, os tratamentos com as concentrações de β -ecdisona aumentaram em 3,06 vezes o percentual total de alterações em relação ao controle negativo (Tabela 5). Comparando-se com o controle positivo, após 48h de exposição o percentual de alterações observado no tratamento com 0,15mg/mL de β -ecdisona foi 7,52% maior e estatisticamente significativo (Dunnett, $p < 0,05$) (Tabela 5).

Quando consideradas as alterações individuais, os efeitos significativos em relação aos controles negativos foram observados já para o tratamento de 0,15mg/mL de β -ecdisona (Dunnett, $p < 0,05$) (Tabela 5). Com 24h de exposição, este tratamento induziu um aumento significativo no percentual de cromossomos aderentes (3,47 vezes maior do que o controle negativo), perda cromossômica (2,43 vezes), ponte cromossômica (3,03 vezes), migração tardia (30,03 vezes) e anáfase multipolar (15,79 vezes) (Dunnett, $p < 0,05$) (Tabela 5). Já com 48h de exposição, estes aumentos foram ainda mais severos: cromossomos aderentes (9,00 vezes maior do que o controle negativo), perda cromossômica (2,44 vezes), ponte cromossômica (8,64 vezes) e migração tardia (31,33 vezes) (Dunnett, $p < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5. Percentual de alterações cromossômicas após exposição às concentrações de β -ecdisona.

Tratamentos	Percentual total de alterações	Cromossomos Aderentes	c-metáfase	Perda cromossômica	Fragmentos	Ponte	Migração tardia	Anáfase multipolar
24h de exposição								
Controle negativo	7,89 ^b	10,31 ^b	1,16	1,89 ^b	0,21	7,1 ^b	0,78 ^b	1,19 ^b
Controle positivo	19,78 ^a	21,78 ^a	1,75	7,10 ^a	0,12	23,21 ^a	14,67 ^a	4,67 ^a
0,15mg/mL	25,22 ^a	35,78 ^{ab}	0,78	4,60 ^{ab}	0,17	21,56 ^a	23,43 ^{ab}	18,90 ^{ab}
2,40mg/mL	23,21 ^a	31,48 ^{ab}	1,02	4,90 ^{ab}	0,24	19,89 ^a	19,67 ^{ab}	21,22 ^{ab}
48h de exposição								
Controle negativo	5,89 ^b	5,50 ^b	0,78	3,24 ^b	0	2,56 ^b	0,89 ^b	2,31 ^b
Controle positivo	31,26 ^a	42,31 ^a	1,65	6,78 ^a	0,17	27,89 ^a	10,31 ^a	3,45 ^a
0,15mg/mL	38,78 ^{ab}	49,54 ^a	2,70	7,91 ^a	0	22,14 ^a	27,89 ^{ab}	18,97 ^{ab}
2,40mg/mL	29,90 ^a	28,78 ^{ab}	1,90	7,14 ^a	0,76	8,14 ^{ab}	31,21 ^{ab}	11,34 ^{ab}

As médias seguidas pelas letras a e b são estatisticamente diferentes dos controles negativo e positivo, respectivamente (Dunnett, $p < 0,05$).

A análise do percentual de micronúcleos também demonstrou efeito citogenotóxico das concentrações de β -ecdisona (Figura 8). Ambos os tratamentos (0,15 e 2,40mg/mL de β -ecdisona) induziram aumento significativo (Dunnett, $p < 0,05$) no percentual de micronúcleos em comparação com o controle negativo, tanto após 24h de exposição quanto após 48h de exposição (Figura 8). Estes percentuais foram também significativos em relação ao controle positivo (Dunnett, $p < 0,05$) (Figura 8).

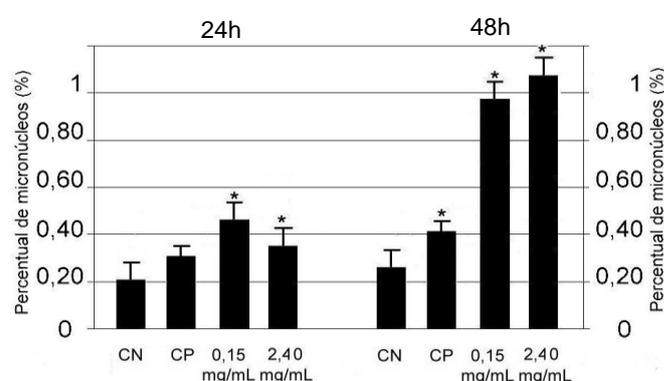


Figura 8. Percentual de micronúcleos após exposição às concentrações de β -ecdisona após 24h de exposição (esquerda) e 48h de exposição (direita). CN = Controle negativo (água destilada); CP = Controle positivo ($MMS\ 4 \times 10^{-4}M$). As médias seguidas por um (*) são estatisticamente diferentes do controle negativo (Dunnett, $p < 0,05$).

5.3.3 EXTRATO AQUOSO

Os resultados obtidos na análise de ciclo celular após exposição ao extrato aquoso de *P. glomerata* são mostrados na Figura 9. Tanto em 24h quanto em 72h de exposição, foi observada diminuição do índice mitótico após exposição ao extrato aquoso (10g/L) (Figuras 9a e 9b) (Dunnett, $p < 0,05$). Entretanto, a análise dos percentuais de fase não revelou diferenças após a exposição ao extrato aquoso (Figura 9). Os resultados da análise de indução de alterações celulares e cromossômicas são mostrados na Tabela 6.

Quando avalia-se o percentual total de alterações celulares/cromossômicas, em ambos os tempos de exposição (24h e 72h), o tratamento de 10g/L do extrato aquoso induziu um aumento significativo em relação ao controle negativo (Dunnett, $p < 0,05$) (Tabela 6).

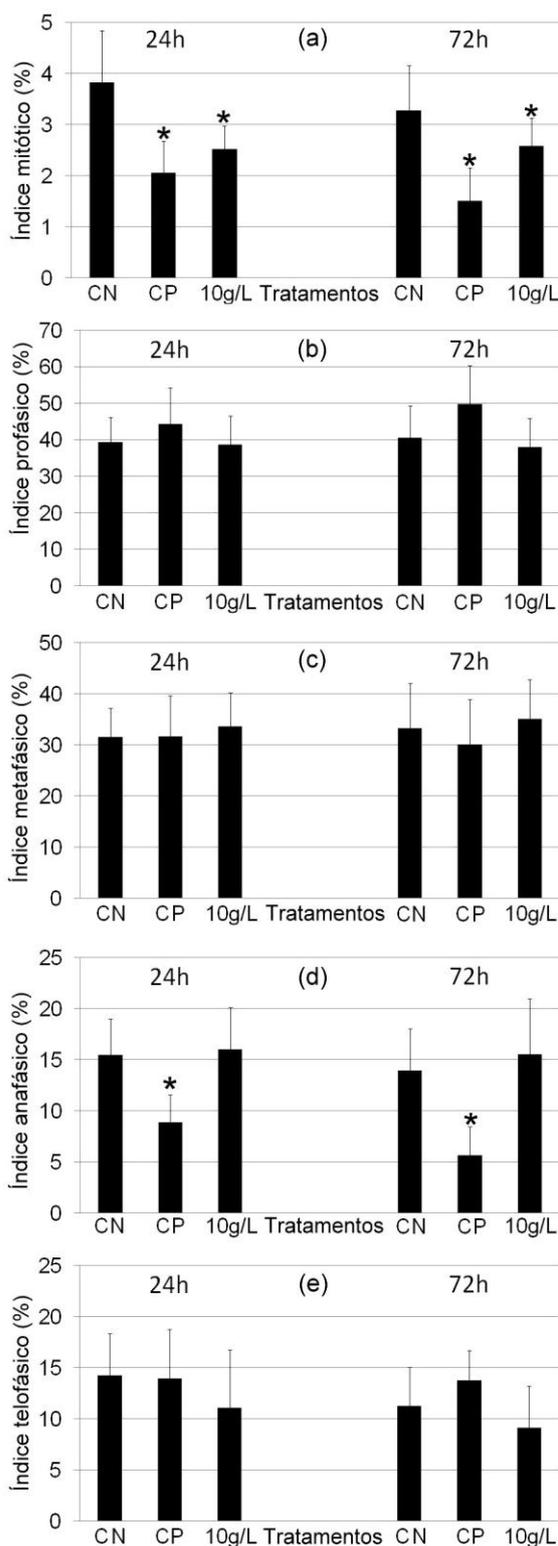


Figura 9. Análise de ciclo celular após exposição ao extrato aquoso de *P. glomerata*. (a, b, c, d, e), respectivamente representam os índices: mitótico, profásico, metafásico, anafásico e telofásico após exposição das células meristemáticas de *Allium cepa* ao extrato aquoso de *P. glomerata* por 24h (esquerda) e 72h (direita). CN = Controle negativo (água destilada); CP = Controle positivo ($MMS\ 4 \times 10^{-4}M$). As médias seguidas por um (*) são estatisticamente diferentes do controle negativo (Dunnett, $p < 0,05$).

Tabela 6. Percentual de alterações cromossômicas após exposição ao extrato aquoso de *P. glomerata*.

Tratamentos	Percentual total de alterações	Cromossomos Aderentes	c-metáfase	Perda cromossômica	Fragmentos	Ponte	Migração tardia	Anáfase multipolar
24h de exposição								
Controle negativo	8,31 ^b	6,75 ^b	0,32	1,29 ^b	0	6,14 ^b	1,33 ^b	0,34
Controle positivo	26,32 ^a	34,66 ^a	1,33	3,31 ^a	0,0	28,03 ^a	13,42 ^a	0,42
10g/L	29,12 ^a	39,34 ^a	0,99	5,93 ^{ab}	0	24,31 ^a	24,64 ^{ab}	1,37 ^{ab}
72h de exposição								
Controle negativo	10,11 ^b	6,52 ^b	0,50	2,42 ^b	0	11,89	5,43 ^b	1,13
Controle positivo	22,35 ^a	22,52 ^a	0,52	3,35 ^a	0,34	14,69	27,10 ^a	0
10g/L	31,23 ^{ab}	40,35 ^{ab}	2,80 ^{ab}	5,53 ^{ab}	0	30,65 ^{ab}	20,79 ^{ab}	2,36 ^{ab}

As médias seguidas pelas letras a e b são estatisticamente diferentes dos controles negativo e positivo, respectivamente (Dunnett, $p < 0,05$).

Quando avalia-se as alterações individuais, os efeitos significativos em relação aos controles negativos foram observados para todas as variáveis analisadas, exceto para c-metáfase e fragmentos após 24h de exposição e fragmentos após 72h de exposição (Dunnett, $p < 0,05$) (Tabela 6). Com 24h de exposição, a ocorrência de cromossomos aderentes após exposição ao extrato aquoso (10g/L) foi 5,82 vezes maior do que no controle negativo. Também foram encontrados aumentos para perda cromossômica (4,59 vezes), pontes cromossômicas (3,95 vezes), migração tardia (20,03 vezes) e anáfase multipolar (4,02 vezes). Estes mesmos aumentos foram respectivamente de 6,18, 2,28, 2,57, 3,82 e 0,21 vezes após 72h de exposição ao extrato aquoso (Dunnett, $p < 0,05$) (Tabela 6). Em comparação com o controle positivo, os percentuais de perda cromossômica, migração tardia e anáfase multipolar após 24h de exposição foram maiores após o tratamento com o extrato aquoso (Dunnett, $p < 0,05$) (Tabela 6). Após 72h de exposição, todas as variáveis analisadas, exceto fragmentos, mostraram percentuais maiores após o tratamento com o extrato aquoso do que aqueles observados para o controle positivo (Dunnett, $p < 0,05$) (Tabela 6).

A análise do percentual de micronúcleos também demonstrou efeito citogenotóxico do extrato aquoso de *P. glomerata* (Figura 10). Tanto em 24h, quanto em 72h de exposição, todos os tratamentos demonstraram efeitos significativos em aumentar o percentual de micronúcleos (Dunnett, $p < 0,05$) (Figura 10). Em ambos os tempos de exposição, o tratamento com o extrato aquoso (10g/L) induziu elevação do percentual de micronúcleos, semelhante ao percentual observado para o controle positivo (Dunnett, $p < 0,05$) (Figura 10).

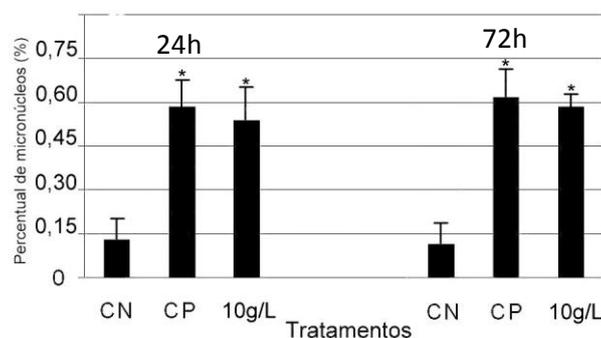


Figura 10. Percentual de micronúcleos após exposição ao extrato aquoso de *P. glomerata* por 24h (esquerda) e 72h (direita). CN = Controle negativo (água destilada); CP = Controle Positivo

Figura 10 (cont). (MMS $4 \times 10^{-4} \text{M}$) As médias seguidas por um (*) são estatisticamente diferentes do controle negativo (Dunnett, $p < 0,05$).

Imagens representativas das fases normais da divisão celular em *Allium cepa* e das alterações aqui descritas são mostradas nas Figuras 11-14.

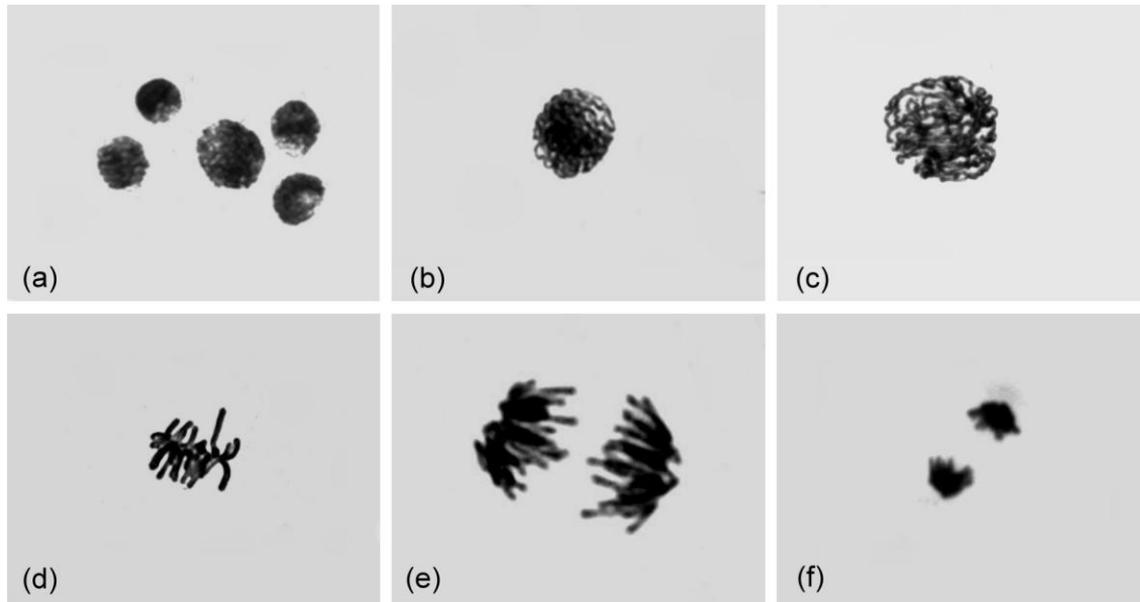


Figura 11. Fases normais do ciclo celular em *Allium cepa*. (a) Núcleos interfásicos; (b) Prófase inicial; (c) Prófase tardia; (d) Metáfase; (e) Anáfase; (f) Telófase.

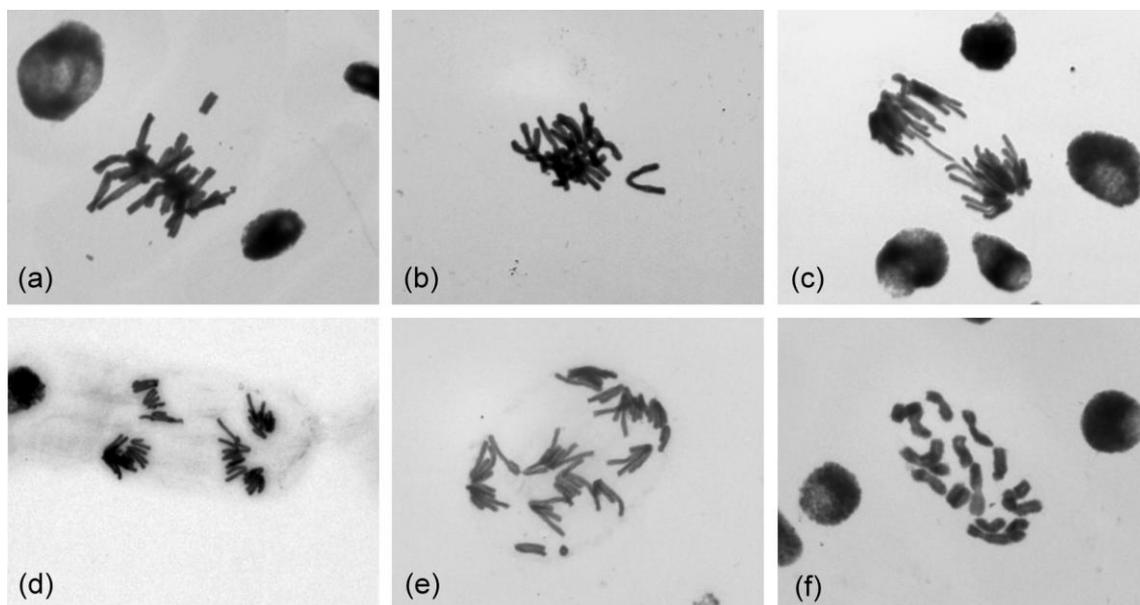


Figura 12. Alterações aneugênicas observadas nas células meristemáticas de *Allium cepa*. (a) Perda cromossômica (não alinhamento cromossômico); (b) Alinhamento tardio; (c) Segregação tardia; (d) Anáfase multipolar; (e) Anáfase multipolar com fragmento cromossômico; (f) c-metáfase.

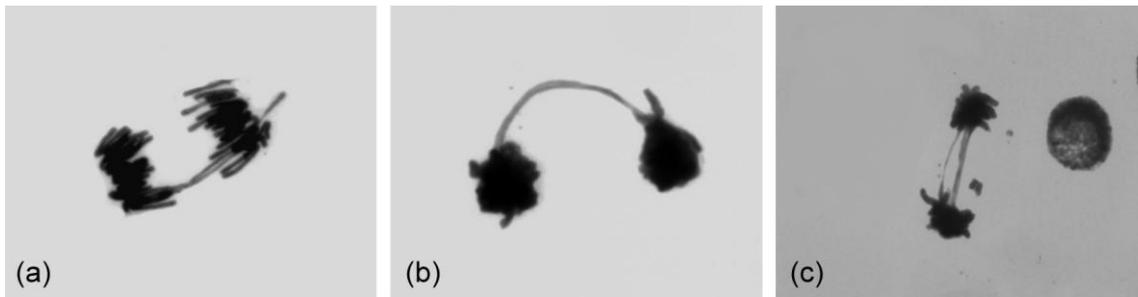


Figura 13. Alterações clastogênicas observadas nas células meristemáticas de *Allium cepa*. (a) Ponte cromossômica em anáfase; (b) Ponte cromossômica em telófase; (c) Ponte cromossômica com a presença de fragmentos cromossômicos.

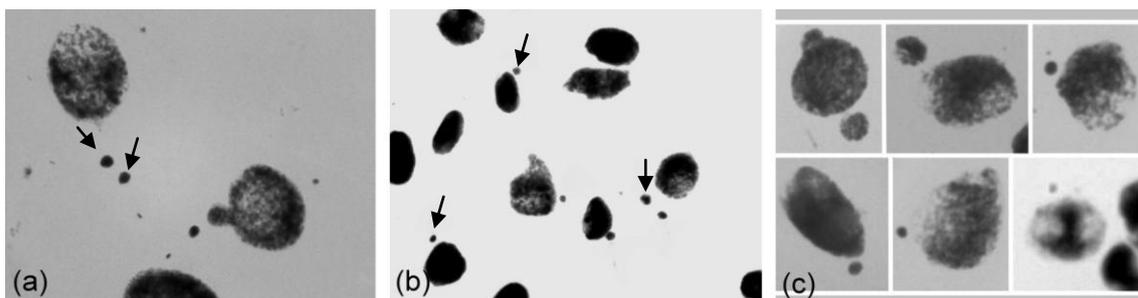


Figura 14. Micronúcleos e *buds* (brotos) observados nas células meristemáticas de *Allium cepa*. (a) Micronúcleos e a presença de um broto; (b) Vários micronúcleos; (c) Em detalhe, observa-se a presença de micronúcleos de diferentes tamanhos.

6 DISCUSSÃO

Os resultados aqui descritos demonstraram efeitos citogenotóxicos dos extratos metanólico e aquoso de *Pfaffia glomerata* e da substância β -ecdisona em células meristemáticas de *Allium cepa*. Foram observados efeitos sobre a dinâmica do ciclo celular, ou seja, interferências sobre os percentuais normais de divisão celular e de fases e sobre a organização e funcionamento do fuso mitótico e dos cromossomos.

Tanto após a exposição aos extratos metanólico e aquoso, quanto à β -ecdisona, reduções significativas nos índices mitóticos foram observadas para alguns tratamentos. O Índice Mitótico (IM), caracterizado pelo percentual de células em divisão, tem sido usado como um parâmetro para acessar a citogenotoxicidade de diversas substâncias. Os índices mitóticos significativamente menores do que os controles negativos podem indicar uma ação sobre o crescimento e desenvolvimento do organismo exposto ao agente testado (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Este efeito foi relatado no presente trabalho para o extrato metanólico, com concentrações iguais ou superiores a 16mg/mL (após 24h de exposição), para a concentração de 2,40mg/mL de β -ecdisona e para o tratamento com o extrato aquoso (10g/L). O mesmo efeito de redução no percentual de células em divisão já foi relatado em inúmeros trabalhos que avaliaram a citogenotoxicidade de plantas, como efeitos dos extratos aquosos de raízes de *Arctium lappa* (FATEMEH e KHOSRO, 2012), de folhas de *Ocimum gratissimum* L. (BOROOAH, 2011) frutos de *Sambucus nigra* (BRATU et al., 2012), do extrato metanólico de *Euphorbia hirta* (PING et al., 2012), do extrato em gel de *Aloe vera* (ILBAS et al., 2012) e da fração do extrato acetato de etila de *Aglaia odorata* (TEERARAK et al., 2012).

Paralelo à redução do índice mitótico, em alguns casos foi observado um aumento significativo do percentual de células em prófase. Kurás et al. (2009) relataram este mesmo efeito em células meristemáticas de *Allium cepa* após o tratamento com extrato aquoso da casca de *Uncaria tomentosa*. Segundo estes autores, este efeito pode representar um bloqueio no ponto de checagem entre prófase e metáfase, chamado de ponto Chfr, como descrito por Scolnic e

Halazonetis (2000). Estes últimos autores, demonstraram este efeito em células tratadas com uma substância que induz despolimerização dos microtúbulos (noctodasol). A observação de diversas alterações relacionadas ao mau funcionamento do fuso mitótico nos resultados aqui encontrados pode corroborar esta hipótese de bloqueio no ponto de checagem Chfr.

Alguns dos tratamentos investigados também induziram aumento significativo no percentual de células em metáfase e telófase. O bloqueio em metáfase e o consequente aumento no percentual de células nesta fase pode ser uma consequência de dois processos, ambos relatados nos resultados aqui descritos: a indução de cromossomos aderentes e de c-metáfase.

A indução de cromossomos aderentes foi a alteração mais frequentemente encontrada para a maioria dos tratamentos. Os cromossomos aderentes são consequência de um efeito tóxico sobre a organização da cromatina, mais precisamente sobre a matriz proteínica da cromatina, sendo muitas vezes um efeito irreversível que conduz a morte celular (FISKESJÖ e LEVAN, 1993; MARCANO e DEL-CAMPO, 1995; MARCANO et al., 1998; FERNANDES et al., 2009). A presença de cromossomos aderentes foi um efeito marcante nos resultados aqui encontrados. A predominância de aderência cromossômica em comparação com outras alterações, também foi relatada por Silva et al. (2011b), em um estudo sobre o efeito citotóxico de óleos essenciais de duas espécies de *Heterothalamus* (Asteraceae). A presença de c-metáfase, por sua vez, representa a evidência de um efeito sobre a organização do fuso mitótico (RAY et al., 2013). Esta alteração surge com a completa inativação do fuso mitótico, com consequente não alinhamento dos cromossomos na placa equatorial da célula e progressão do ciclo celular (FISKESJÖ, 1985, FISKESJÖ e LEVAN, 1993; RAY et al., 2013). Fernandes et al. (2009) levantaram a possibilidade de que estas duas alterações possam ter uma relação. Segundo estes autores, a ocorrência de cromossomos condensados pode conduzir à formação de aderências cromossômicas ou cromatídicas. Diversos trabalhos tem mostrado a ocorrência destes dois tipos de alterações após exposição a produtos naturais: em resposta ao extrato aquoso do líquen *Myelochroa lindmanii* em células de *Zea mays* e *Lactuca sativa* (CAMPOS et al., 2008), ao extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* em

Hordeum vulgare (MIERLICI et al., 2009), ao óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* em *Lactuca sativa* (PAWLOWSKI et al., 2012) e ao extrato aquoso de folhas de *Clerodendrum viscosum* Vent em células de *Allium cepa* (RAY et al., 2013).

Além das c-metáfases, outras alterações aneugênicas também foram encontradas nos resultados aqui relatados, como anáfases multipolares, perda de cromossomos, alinhamento tardio e migração (segregação) tardia. As alterações aneugênicas resultam das interferências sobre a segregação normal dos cromossomos, como aquelas causadas por interferências sobre a função normal dos microtúbulos formadores do fuso mitótico, gerando células aneuploides e poliploides (LAUGHINGHOUSE, 2012). Kuriyama, (1982) observou que alguns agentes aneuploidizantes podem induzir a formação de múltiplos Centros Organizadores de Microtúbulos (COMT). Essas estruturas celulares replicam-se durante o ciclo celular e são responsáveis pela bipolaridade celular durante a segregação dos cromossomos (GHADIMI et al., 2000; SUMARA et al., 2004). A não formação correta do fuso mitótico, pode também induzir a perda de cromossomos que não se ligam ao fuso e, portanto não segregam (SHAMINA et al., 2003; GISSELSSON et al., 2004). Algumas metáfases observadas nos resultados do presente estudo (dados não mostrados) evidenciaram a ocorrência de aneuploidia, o que corrobora a ocorrência de perdas cromossômicas. Do mesmo modo, a ocorrência de migração tardia dos cromossomos ou o alinhamento tardio evidenciam um provável efeito aneugênico dos agentes aqui testados. A migração (segregação tardia) dos cromossomos é apontada como um efeito muito mais em decorrência de um problema na despolimerização dos microtúbulos, do que na polimerização (FERNANDES, et al., 2009). Neste caso, o encurtamento dos microtúbulos durante o processo de anáfase é afetado, conduzindo à segregação tardia de alguns cromossomos. Este representou um dos principais efeitos observados após a exposição aos extratos de *Pfaffia* e à β -ecdisona. Muitos trabalhos tem mostrado efeitos significativos nestes tipos de alterações após exposição a produtos de origem vegetal, como em resposta ao extrato aquoso de *Loranthus micranthus* (IWALOKUN, et al., 2011), extrato metanólico

de *Jasminum officinale* (TEERARAK et al., 2010) e ao extrato aquoso de *Arctium lappa* (FATEMEH e KHOSRO, 2012).

Adicionalmente às alterações aneugênicas, os extratos de *Pfaffia glomerata* e a β -ecdisona também induziram um aumento significativo na ocorrência de pontes cromossômicas em anáfase e telófase. As pontes cromossômicas podem se formar através da ocorrência de rearranjos cromossômicos com a formação de cromossomos dicêntricos, ou através da ocorrência de quebras terminais nos cromossomos conduzindo à fusão de cromátides (SINGH, 2003). Neste caso, as pontes são classificadas como alterações clastogênicas, que são aquelas relacionadas à ocorrência de quebras no DNA (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Entretanto, de acordo com Marcano et al. (2004) a aderência da cromatina também pode determinar pontes cromossômicas, uma vez que os cromossomos tendem a permanecer unidos. Giacomelli (1999) salienta que as pontes formadas por aderência podem ser múltiplas e ainda persistir até a fase de telófase. Nos resultados desse estudo, pontes em telófase foram encontradas. Sendo assim, as pontes cromossômicas também poderiam ocorrer em manifestação ao efeito tóxico sobre a cromatina. Deste modo, a distinção entre a ocorrência de pontes por um efeito clastogênico ou tóxico não é fácil. A ocorrência de quebras cromossômicas representa uma evidência a favor do efeito clastogênico, embora esta alteração não tenha sido percebida como um dos principais efeitos. Entretanto, muito provavelmente, os dois mecanismos geradores de pontes estão presentes nos resultados aqui descritos. Um dos resultados que corrobora esta observação é a presença de micronúcleos com diferentes tamanhos, como será discutido posteriormente.

Os micronúcleos são corpúsculos similares ao núcleo principal, formados por cromossomos ou partes destes que se encontram dispersos no citoplasma (SILVA e NEPOMUCENO, 2010). Surgem como resultado de quebras cromossômicas, formando fragmentos acêntricos (efeito clastogênico) ou da perda de cromossomos inteiros (efeito aneugênico) que não se ligam ao fuso e, assim, não chegam aos pólos da célula durante os processos de mitose ou meiose (MENEGUETTI et al., 2011). O fragmento cromossômico acêntrico ou o cromossomo inteiro não se integram ao novo núcleo e podem constituir

um pequeno núcleo individual, chamado de micronúcleo (FENECH, 1993; COSTA e MENK, 2000). A análise do tamanho dos micronúcleos permite inferir e distinguir sobre a existência de efeitos clastogênicos e aneugênicos. De modo geral a perda de fragmentos cromossômicos conduz à formação de micronúcleos menores que a perda de cromossomos inteiros. A relação entre o tamanho dos micronúcleos e o núcleo celular permite a distinção destes efeitos. Nos resultados aqui descritos, foram encontrados diferentes tamanhos de micronúcleos, o que evidencia o provável envolvimento tanto de clastogenicidade quanto de aneugenicidade nos efeitos dos extratos de *Pfaffia glomerata* e de β -ecdisona.

Uma questão importante a se discutir foi o uso do MMS como controle positivo. O MMS é uma das substâncias mais empregadas como controle positivo em ensaios de mutagenicidade, por apresentar ação tóxica. É uma substância alquilante, comprovadamente mutagênica, que apresenta ação direta sobre o DNA (CARVALHO, 2009; MUNHOZ et al., 2012). Sua genotoxicidade é mediada por modificações de base que enfraquecem ligações N-glicosídicas, o que causa a despurinação/despirimidinação do DNA. A despurinação /despirimidinação favorece o surgimento de sítios apurínicos e, como resultado, AP endonucleases clivam DNA adjacentes aos sítios AP, gerando quebras nas moléculas (HORVÁTHOVA et al., 1998; BOITEUX e GUILLET, 2004). A substância também pode atuar através da alquilação de grupos fosfato do DNA (VOGEL, 1982) e é capaz de induzir alterações cromossômicas e a formação de micronúcleos (OLIVEIRA et al. 2011). A utilização deste composto como controle positivo nos experimentos permite verificar a susceptibilidade do material genético à toxidez e às alterações investigadas. Em conjunto com a utilização do controle negativo, pode ainda ser utilizado como um parâmetro de comparação da gravidade das alterações observadas pelas substâncias de interesse. Para muitas variáveis analisadas nos experimentos aqui conduzidos, os percentuais de alterações após exposição aos extratos de *Pfaffia* e à β -ecdisona foram estatisticamente superiores aos encontrados para o controle positivo. Isso demonstra um forte efeito citogenotóxico dos extratos de *Pfaffia*.

Apesar do aumento do percentual de alterações com a elevação da dose do extrato metanólico, nas maiores concentrações (128 e 256 mg/mL), foi observada diminuição do percentual total de alterações. Esta redução pode ser explicada pela diminuição do índice mitótico (número de células em divisão) também observada nestas duas concentrações.

Não existiram grandes diferenças quando compara-se os dois extratos (aquoso e metanólico) de *Pfaffia* utilizados nos ensaios de citogenotoxicidade. Em ambas as situações os mesmos tipos de efeitos foram observados e as mesmas alterações foram relatadas.

Estudos anteriores mostraram que as raízes de *Pfaffia glomerata* são ricas em terpenoides, saponinas triterpênicas e ecdisteroides, sendo a β -ecdisona o ecdisteroide de maior importância comercial. A presença de saponinas em suas raízes já foi relatada por Vigo et al. (2003, 2004), e o teor de β -ecdisona foi anteriormente investigado por Vigo et al. (2002), Festucci-Buselli (2008), e Serra et al. (2012). A presença destas substâncias nas raízes de *Pfaffia glomerata* é relacionada às diversas atividades biológicas da espécie.

A presença da substância β -ecdisona no extrato metanólico obtido do acesso utilizado no presente trabalho foi comprovada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados mostraram a presença de 1,93% de β -ecdisona no extrato metanólico, que corresponde a 0,34% na raiz seca. Estes valores são condizentes com valores já citados na literatura para a espécie. De acordo com Nishimoto et al. (1987), o teor de β -ecdisona em raízes secas de *P. glomerata* pode variar entre 0,29 e 0,76%. Marques et al. (2004), avaliando extrato metanólico obtido em Soxlet, encontraram 1,07% de β -ecdisona nas raízes. Os mesmos autores já haviam relatado a presença de 0,96% da substância em extrato obtido por turbólise e com uso de solventes orgânicos (Marques et al, 2002). Mais recentemente, Serra et al. (2012) relataram a presença de 1,63% de β -ecdisona em extrato seco de *P. glomerata*.

Na tentativa de correlacionar os dados de citogenotoxicidade obtidos com a exposição aos extratos, um ensaio de citogenotoxicidade foi realizado com a β -ecdisona comercial. A substância mostrou-se potencialmente citogenotóxica para todas as variáveis averiguadas nos experimentos. A escolha da

concentração de 2,40mg/mL de β -ecdisona como um dos tratamentos investigados baseou-se na observação de alguns produtos comerciais, como cápsulas com o pó da raiz de *Pfaffia glomerata* que descrevem na bula um conteúdo de β -ecdisona próximo a esta concentração. Tanto esta concentração, como uma concentração 16 vezes menor (0,15mg/ml) mostraram-se citogenotóxicas.

Flores et al. (2009), com o objetivo de padronizar a metodologia de extração de ecdisterona de raízes de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa*), concluíram que o metanol é o solvente mais eficiente para extrair este tipo de substância, sendo ainda mais eficiente do que o clorofórmio. Dessa forma, acredita-se que o extrato metanólico testado no presente trabalho apresente um teor de ecdisteroides mais elevado do que o extrato aquoso. Como os resultados de citogenotoxicidade foram relatados para ambos os extratos, outras substâncias além da β -ecdisona podem estar relacionadas ao efeito tóxico aqui discutido. Neste caso, substâncias citogenotóxicas solúveis em água podem estar presentes em maiores quantidades no extrato aquoso do que no metanólico.

As saponinas representam outra classe de substâncias potencialmente envolvidas na citogenotoxicidade dos extratos aqui investigados. As saponinas são glicosídeos caracterizados por seu sabor amargo e adstringente e apresentam-se em forma de espuma em meio aquoso (GUILLAUME, 1999). De acordo com Silva et al. (2012b), causam hemólise em hemácias de mamíferos e inibem o crescimento e a atividade de microorganismos presentes no rúmen (TAIZ e ZEIGER, 2004; KAMRA, 2005). Além disso, estudos demonstram que algumas classes de saponinas causam aborto e morte fetal em ruminantes e monogástricos (HANSON et al., 1973). As saponinas derivadas de plantas são geralmente associadas a sistemas de defesa contra herbívoros (AUGUSTIN et al., 2011) e apresentam também atividade fungicida (LEE et al., 2001; MORRISSEY e OSBOURN, 1999; SAHA et al., 2010; SUNG e LEE, 2008a), antimicrobiana (AVATO et al., 2006; SUNG e LEE, 2008b), alelopática (WALLER et al., 1993), inseticida (SANDERMANN e FUNKE, 1970; SHINODA et al., 2002; KUZINA et al., 2009; NIELSEN et al., 2010) e moluscicida (ALADESANMI, 2007; GOPALSAMY et al., 1990; HOSTETTMANN, 1980;

HUANG et al., 2003). Gauthier et al (2011), em uma revisão acerca de atividades farmacológicas de saponinas triterpênicas, enfatizou que esta classe de substâncias apresenta diversas propriedades, como citotoxicidade, atividade anti-tumoral e anti-inflamatória e inibição da atividade da lipase pancreática (GAUTHIER et al., 2011). No mesmo ano, Dubois et al. (2011) também demonstraram efeito citotóxico de saponinas. Trabalhos similares ao aqui realizado para *Pfaffia glomerata* relataram a presença de saponinas em extratos vegetais e as mesmas estão relacionadas com alterações nos índices mitóticos (MENDES et al., 2012; THENMOZHI e RAO, 2012; RAY et al., 2013).

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que os extratos de *Pfaffia glomerata* apresentam efeitos citóxicos e genotóxicos, principalmente quando administrados em concentrações elevadas. Efeitos similares já foram observados para outras espécies medicinais como *Malpighia glabra* L. (DUSMAN et al., 2012), *Helicrysum plicatum* (EROGLU et al., 2010), *Passiflora alata* (BOEIRA et al., 2010), *Crotun caudatus* (LEISHANGTHEM e THOUNOAJAM, 2011), *Linaria genstifolia* (LIMAN et al., 2012), *Nauclea latifolia* (LIU et al., 2011) e *Jasminun officinale* L. (TEERARAK et al., 2010).

A exposição de organismos vivos, especialmente humanos, a certas substâncias, pode levar ao desenvolvimento de mutações (RIBEIRO e MARQUES, 2003) e o uso indiscriminado de plantas medicinais pode causar efeitos danosos ao organismo e, por isso, deve ser feito de forma cautelosa (TEDESCO e LAUGHINGHOUSE IV, 2012). De acordo com Maciel et al. (2005), o principal problema do uso plantas medicinais está em sua preparação, que muitas vezes não possui certificado de qualidade e os metabólitos podem ser misturados a outras substâncias, modificando sua pureza. Os extratos de plantas são formados por uma mistura de componentes variados que, muitas vezes atuam em diferentes alvos, enquanto os fármacos industrializados são geralmente preparados com apenas um princípio ativo e, assim, agem em alvos mais específicos (FERREIRA e PINTO, 2010; FIRMO et al, 2011).

É preciso considerar ainda que o efeito antimitótico de *P. glomerata* pode ter outras aplicações. Substâncias capazes de inibir a divisão celular podem apresentar vantagens no controle de pragas agrícolas ou no controle da

divisão celular descontrolada, característica de células tumorais. Neste contexto, um estudo realizado com *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (PIRES et al., 2001) mostrou que o extrato aquoso desta espécie foi capaz de inibir o índice mitótico e o crescimento radicular de plantas daninhas (*Desmodium adscendens*). A fitotoxidez de leucena foi atribuída a diversos aleloquímicos presentes em sua composição (CHOU e KUO, 1986). Devido à capacidade de inibir a germinação e o crescimento radicular, a cobertura do solo com leucena pode ser empregada como uma estratégia para o controle de plantas daninhas (BUDELMAN, 1988). De acordo com Souza Filho et al. (1997), a interferência no desenvolvimento radicular é um dos principais indicadores para o estudo de extratos com potencial alelopático. Diversos estudos também mostram a utilização de espécies vegetais para a produção de fármacos na luta contra o câncer, como por exemplo, *Catharanthus roseus* L. (NEWMAN et al., 2000; CHIN et al., 2006), *P. peltatum* e *P. emodii* (NEWMAN et al., 2003) e *Camptotheca acuminata* (GUERRA et al., 2005). Assim, sugere-se que extratos de *P. glomerata* podem ser testados com fins alelopáticos ou até mesmo como fonte de novos medicamentos para o tratamento de tumores.

Em relação ao uso de *P. glomerata* com fins terapêuticos, tanto na forma de cápsulas quanto de decocto, os resultados aqui encontrados sugerem o uso em doses baixas e de forma racional, uma vez que foram encontradas alterações cromossômicas e efeito antimitótico nos ensaios de *Allium cepa*. Além disso, fica evidente a necessidade de padronização do uso e produção deste fitoterápico, bem como sua regulamentação pela Farmacopeia Brasileira, além de futuras investigações que permitam identificar quais os principais componentes envolvidos nos processos e/ou alterações descritos no presente trabalho.

7 CONCLUSÕES

Os ensaios com *Allium cepa* mostraram ação tóxica e genotóxica tanto para o extrato aquoso de *P. glomerata* quanto para o extrato metanólico. Estes efeitos são provavelmente devido à presença de saponinas e ecdisteróides (β -ecdisona) presentes nas raízes da espécie, não descartando o envolvimento de outros agentes genotóxicos. A relação entre as doses dos extratos e a intensificação de seus efeitos também foi comprovada pelos ensaios realizados. Assim, é preciso determinar a dose ideal para consumo humano, sem trazer riscos à saúde. Fica evidente, portanto, a necessidade de padronização da produção e comercialização desta espécie com fins terapêuticos, observando-se que doses elevadas podem ser prejudiciais ao homem.

Além disso, sugere-se a possibilidade de exploração dos potenciais alelopáticos e anti-cancerígenos da espécie, tendo em vista seu efeito antimitótico. Para estes propósitos, estudos com outros modelos vegetais e animais são necessários e poderão contribuir para o uso adequado e melhor aproveitamento de *P. glomerata* pela população.

Os resultados obtidos com o presente trabalho servem, portanto, como alerta para o uso racional da espécie *P. glomerata* e indicam a necessidade de estudos mais aprofundados acerca de seus efeitos sobre as células.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). 2011. Resolução - RE nº 5.052, de 10 de novembro de 2011. Disponível em <http://www.in.gov.br/autenticidade.html>, pelo código 00012011111400065. **Diário Oficial da União**, **218 (1)**: 65.

AKINBORO, A.; BAKARE, A.A. 2007. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, **112**: 470–475.

AKINTONWA, A.; AWODELE, O.; AFOLAYAN, G.; HERBERT, A.B. 2009. Coker mutagenic screening of some commonly used medicinal plants in Nigeria. **Journal of Ethnopharmacology**, **125**: 461–470.

ALADESANMI, A.J. 2007. *Tetrapleura tetraptera*: molluscicidal activity and chemical constituents. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines**, **4**: 23–36.

ALCÂNTARA, M.F.A. 1994. Atividade antimicrobiana de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil – Fortaleza –CE**. p072.

AL-MOARUF, O.A.; MUIBAT, O.B.; ASIATA, O.I.; ISIAKA, A.O.; NURENI, O.O. 2004. Heavy trace metals and macronutrients status in herbal plants. **Journal of Food Chemistry**, **85**: 67–71.

ALVES, R. B. N. 2008. **Caracterização morfológica, química e conservação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen**. Tese de Doutorado em Agronomia (Horticultura). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/Botucatu. 112p.

ALVIM, N. R.; CUNHA, K. C. T.; CORTEZ, L. E. R.; BAZOTTE, R. B.; MARQUES, L. C.; CORTEZ, D. A. G. 1999. Efeitos biológicos da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e da *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze (Amaranthaceae). **Acta Scientiarum**, **21(2)**: 349-352.

ANANTHAKRISHNAN, M.; KUMARASAMY, K.; ANTONY, A.S. 2012. Genotoxic effects of Furadan and Enodosulphan on *Allium cepa* root tips. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, **6(1)**: 126-131.

ANDRADE-VIEIRA, L.F.; GEDRAITE, L.S. CAMPOS, J.M.S.; DAVIDE, L.C. 2012. Spent Pot Liner (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **74 (4)**: 882–888.

ARLETTI, R.; BENELLI, A.; CAVAZZUTI, E.; SCARPETTA, G.; BERTOLINI, A. 1999. Stimulating Property of *Tumera diffusa* and *Pfaffia paniculata* Extracts on the Sexual Behavior of Male Rats. **Psychopharmacology**, **143 (1)**: 15-19.

ARUMUGAM, T.; PREMALASHMI, V.; THERADIMANI, M. 2010. Effect of biopesticides, organic amendments and chemicals on the incidence of leaf spot (*Cercospora rauwolfiae*) in sarpagandha. **Green Farm**, **1**: 633-635.

AUGUSTIN, J.M.; KUZINA, V.; ANDERSEN, S.B.; BAK, S. 2011. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, **72**: 435–457.

AVATO, P.; BUCCI, R.; TAVA, A.; VITALI, C.; ROSATO, A.; BIALY, Z.; JURZYSTA, M.; 2006. Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* sp.: structure–activity relationship. **Phytotherapy Research**, **20**: 454–457.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. 2005. Drug discovery from medicinal plants. **Life Science**, **78**: 431-436.

BAUMGARTNER, S.; BETTI, L.; HEUSSER, P.; JAGER, T. SCHERR, C.; MAJEWSKY, V.; WOLF, U. 2012. Use of plant bioassays in homeopathic basic research – a systematic review. **High Dilution Research**, **11(40)**:140-141.

BELCAVELLO, L.; CUNHA, M.R.H.; ANDRADE, M.A.; BATITUCCI, M.C.P. 2012. Cytotoxicity and DNA damages induced by the *Zornia diphylla* extract, a medicinal plant. **Natureza on line**, **10 (3)**: 140-145.

BENTES, L.B.; SILVA, J.F.; HIDALGO, A.F. 2000. Época de colheita de *Pfaffia glomerata* em Manaus – Amazonas. **Anais da Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, Botucatu. Unesp**. p3.

BERG, J. M. T.; LUBERT, J. 2008. Bioquímica. 6.Ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 545p.

BOEIRA, J.M.; FENNER, R.; BETTI, A.H.; PROVENSÍ, G.; LACERDA, L.A.; BARBOSA, P.R.; GONZÁLEZ, F.H.D.; CORRÊA, A.M.R.; DRIEMEIER, D.;

DALL'ALBA, M.P.; PEDROSO, A.P.; GOSMANN, G.; SILVA, J., RATES, S.M.K. 2010. Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, **128**: 526–532.

BOITEUX, S.; GUILLET, M. 2004. Abasic sites in DNA: Repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. **DNA repair**, **3**: 1-12.

BOROOAH, D.D. Genotoxicity assessment of water extract of *Ocimum gratissimum* L. using the *Allium cepa* assay. International **Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences**, **1 (2)**: 185-188.

BRATU, M.M; DOROFTEI, E.; PIRJOI, T.N.; HOSTINA, C.; PORTA, S. 2012. Determination of Antioxidant Activity and Toxicity of *Sambucus nigra* Fruit Extract Using Alternative Methods. **Food Technology and Biotechnology**, **50 (2)**: 177–182.

BREKHMANN, I.I.; DARDYMOV, I.V. 1969. New substances of plants origin which increase non-specific resistance. **Annual Review of Pharmacology**, **9**: 419–430.

BUDELMAN, A. 1988. The performance of the leaf mulches of *Leucaena leucocephala*, *Flemingia macrophylla* and *Gliricidia sepium* in weed control. **Agroforestry Systems**, **6**: 137-145,

CAMPOS, J.M.S.; DAVIDE, L.C.; SOARES, G.L.G.; VICCINI, L.F. 2008. Mitodepressive and clastogenic effects of aqueous extracts of the lichens *Myelochroa lindmanii* and *Canoparmelia texana* (Lecanorales, Parmeliaceae) on meristematic cells in plant bioassays. **Genetics and Molecular Biology**, **31 (1)**: 141-145.

CARULO, M.F. 2012. Use of SFC in Extraction of Adaptogens from Brazilian Plants. **American Journal of Analytical Chemistry**, **3**: 977-982.

CARVALHO, N.C. 2009. **Avaliação do potencial genotóxico e antígeno-tóxico de *Melissa officinalis***. Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. 45p.

CASTRO, J. A. 1993. Toxicología básica: mecanismos de toxicidade y sus aplicaciones. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, **2**: 197-206.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. 2008. Bioquímica Ilustrada. 4. Ed. Porto Alegre: **Artmed**, 533p.

CHISAKI, K. C. L.; SILVA, F. S. B.; JUNIOR, M. V. A.; ALBUQUERQUE, U. P.; SILVA, F. C. L. 1998. Morfodiagnose dos órgãos aéreos do acônito (*Pfaffia glomerata* [Spreng.] Peders.). **XV Simpósio Brasileiro de Plantas Mediciniais do Brasil. Águas de Lindóia – SP.**

CHOU, C.H.; KUO Y.L. 1986. Allelopathic research of subtropical vegetation in taiwan. III. Alelopathic exclusion of understrory by *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. **Journal of Chemical Ecology**, **12**: 1431-1448.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; CORTEZ, D.A.G. 2002. Aspectos gerais da espécie Fáfia (*Pfaffia glomerata* Pedersen) e recomendações técnicas para seu cultivo. **Antigua**, 12p.

CORRÊA-JÚNIOR, C.; MING, L.C. 2008. Sazonalidade na produção de raízes e teor de β -ecdisona em acessos de fáfia. **Horticultura Brasileira**, **26**: 393-397.

COSTA, R.M.A; MENK, C.F.M. 2000. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 24-26.

CROTEAU, R., KUTCHAN, T. M., LEWIS, N. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Americam Society of Plant Physiologists**, 1250-1318.

DAS B.; SATYALAKSHMI, G. 2012. Natural Products Based Anticancer Agents. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, **9 (2)**: 169-177.

DOLABELA, M.F.; OLIVEIRA, S.G.; PERES, J.M.; NASCIMENTO, J.M.S.; PÓVOA, M.M; OLIVEIRA, A.B. 2012. *In vitro* antimalarial activity of six *Aspidosperma* species from the state of Minas Gerais (Brazil). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **84 (4)**: 889-910.

DUBOIS, M.A.L.; PEGNYEMB, D.E.; NOTE, O.P.; OFFER, A.C.M. 2011. A review of acacic acid-type saponins from Leguminosae-Mimosoideae as potent cytotoxic and apoptosis inducing agents. **Phytochemistry Reviews**, **10**: 565–584.

DUKE, S.O.; ROMAGNI, J.G.; DAYAN, F.E. 2000. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. **Crop Protection**, **19**: 583 – 589.

DUSMAN, E.; FERREIRA, M.F.S.; BERTI, A.P.; MARIUCCI, R.G.; MANTOVANI, M.S.; VICENTINI, V.E.P. 2012. Investigation of cytotoxic and mutagenic effects of *Malpighia glabra* L.(barbados cherry) fruit pulp and vitamin C on plant and animal test systems. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, **32(2)**: 405-411.

EDDOUKS, M.; CHATTOPADHYA, D.A.; DE FEO, V.; CHO, W.C. 2012. Medicinal plants in the prevention and treatment of chronic diseases. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2p.

EDZIRI, H.; MASTOURIB, M.; AOUNIA, R.; ANTHONISSENC, L.; VERSCHAEVEEC, D. 2013. Investigation on the genotoxicity of extracts from *Cleome amblyocarpa* Barr. and Murb, an important Tunisian medicinal plant. **South African Journal of Botany**, **84**: 102-103.

EFFERTH, T.; HERMANN, F.; TAHRANI, A.; WINK, M. 2011. Cytotoxic activity of secondary metabolites derived from *Artemisia annua* L. towards cancer cells in comparison to its designated active constituent artemisinin. **Phytomedicine**, **18 (11)**: 959-969.

EROGLU, H.E.; BUDAK, U.; GLU, E.H.; AKSOY, A.; ALBAYRAK, S. 2010. *In vitro* cytotoxic effects of methanol extracts of six *Helichrysum* taxa used in traditional medicine. **Pakistan Journal of Botany**, **42 (5)**: 3229-3237.

FANK-DE-CARVALHO, S.N.; MARCHIORETTO, M.S. 2012. Amaranthaceae as a Bioindicator of Neotropical Savannah. **Diversity Biodiversity Enrichment in a Diverse World**, **2**: 235-262.

FÃO, F.; ZAN, R.A.; BRONDANI, F.M.M; RAMOS, L.J.; MENEGUETTI, D.U.O. 2012. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Müll. Arg), no estado de Rondônia, Amazônia Ocidental. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, **7 (1)**: 91-98.

FASOLA, T.R.; EGUNYOMI, A. 2005. Nigerian usage of bark in phytomedicine. **Journal of Plants People and Applied Research**, 73–77.

FATEMEH, K.; KHOSRO, P. 2012. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous root extract of *Arctium lappa* on *Allium cepa* Linn root tip cells. **International Journal of Agronomy and Plant Production**, **3 (12)**: 630-637.

FENECH, M. 1993. The cytokinesis - block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. **Mutation Research**, **285**: 35 -44.

FENNER, R.; ZIMMER, A.R.; NEVES, G.; KLIEMANN, M.; GOSMANN, G.; RATES, S.M. K. 2008. Hypnotic effect of ecdysterone isolated from *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, **18 (2)**: 170-176.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. 2009. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent - trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **72**: 1680 –1686.

FERREIRA, C.F.; FRUEH, A.B.; DUSMAN, E.; HECK, M.C.; VICENTINI, E.P. 2012. Avaliação da citotoxicidade das águas dos ribeirões Varginha (Califórnia-PR) e Tabatinga (Mandaguari-PR), em *Allium cepa* L. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, **7 (2)**: 46-54.

FERREIRA, V.F.; PINTO, A.C. 2010. A Fitoterapia no mundo atual. **Química Nova. São Paulo**, **33 (9)**: 1829p.

FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; VIEIRA, R.F.; OTONI, W.C. 2008. Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata* development. **Brazilian Society of Plant Physiology**, **20 (4)**: 305-311.

FIGUEIREDO, L. S. 2004. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* nas condições de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. **Revista brasileira de plantas medicinais**, **7 (1)**: 67-72.

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G. 2011. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa, São Luís**, **18**: 90-95.

FISKESJÖ, G. 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, **102**: 99-112.

FISKESJÖ, G.; LEVAN, A. 1993. Evaluation of the first ten MeIC chemicals in the *Allium cepa*. **Atlas**, **21**: 139–149.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; VASCONCELLOS, N.J.S. 2006. Indução de calos e aspectos morfogenéticos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, **8** (3): 89-95.

FRAGA, M.C. 2004. **Efeitos do pré-tratamento com *Panax quinquefolium* (ginseng americano) sobre o tremor induzido pela oxotremorina em ratos.** Dissertação de Mestrado. Curso de Fisiopatologia Clínica e Experimental. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 77p.

FRANCO, M.J.; CAETANO, I.C.S.; CAETANO J.D.; DRAGUNSKI, D.C. 2011. Determinação de metais em plantas medicinais comercializadas na região de Umuarama-PR. **Arquivo Ciências da Saúde**, **15** (2): 121-127.

FREITAS, L.L.; PEREIRA, T.N.S.; NETO, M.F.; PEREIRA, M.G. 2010. Determinação da concentração ideal de colchicina como indutora de poliploidia em mamoeiro (*Carica papaya* L.). **II Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica**, **7**(3): 1-4.

GADEVA, P.; DIMITROV, B. 2008. Genotoxic effects of the pesticides Rubigan, Omite and Rovral in root-meristem cells of *Crepis capilaris*. **Mutation Research**, **652**: 191-195.

GAHUKAR, R.T. 2012. Evaluation of plant-derived products against pests and diseases of medicinal plants: A review. **Crop Protection**, **42**: 202 – 209.

GAUTHIER, C.; LEGAULT, J.; PIOCHON-GAUTHIER, M.; PICHETTE, A. 2011. Advances in the synthesis and pharmacological activity of lupane-type triterpenoid saponins. **Phytochemistry Reviews**, **10**: 521–544.

GAVRONSKI, L. 2008. **Avaliação da Mutagênicidade de Amostras de Água do Rio dos Sinos através do Teste *Allium cepa*.** Dissertação de Mestrado em Toxicologia Aplicada - Universidade Luterana do Brasil, Canoas.

GHADIMI, B.M.; SACKETT, D.L.; DIFILIPPATONIO, M.J.; SCHR CK, E.; NEUMANN, T.; JAUHO, A. 2000. Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations. **Genes Chromosomes Cancer**, **27**: 183–190.

GIACOMELLI, F.R.B. 1999. **Avaliação do comportamento meiótico em variedades de aveia (*Avena sativa*) recomendadas para região sul**. Dissertação de Mestrado em Genética – Universidade Estadual de Maringá, PR. 131p.

GISSELSSON, D.; PALSSON, E.; YU, C.; MERTENS, F.; MANDAHL, N. 2004. Mitotic instability associated with late genomic changes in bone and soft tissue tumours. **Cancer Letters**, **206**: 69–76.

GOMES, A.C.M.M.; NICOLE, M.; MATTOS, J.K.; PEREIRA, S.I.V.; PEREIRA, P.; da SILVA, D.B., VIEIRA, R.; de CAPIDEVILLE, G.; MOITA, A.W.; CARNEIRO, R.M.D.G. 2010. Concentration of β -Ecdysone (20E) in Susceptible and Resistant Accessions of *Pfaffia Glomerata* Infected with *Meloidogyne incognita* and Histological Characterisation of Resistance. **Nematology Leiden**, **12 (5)**: 701-709.

GOPALSAMY, N.; GUEHO, J.; JULIEN, H.R.; OWADALLY, A.W.; HOSTETTMANN, K. 1990. Molluscicidal saponins of *Polyscias dichroostachya*. **Phytochemistry**, **29**: 793–795.

GRANT, W.F. 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, **310**: 175-185.

GREBENOK, R. J.; VENKATACHARI, S.; ADLER, J.H. 1994. Biosynthesis of ecdysone and ecdysone phosphates in spinach. **Phytochemistry**, **36 (6)**: 1399-1408.

GUILLAUME, J. 1999. Nutrition and feeding of fish and crustaceans. **Versailles: INRA Editions**. 403p.

GUIRADO, O.A.A.; CUÉLLAR, A.C. 2008. Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, **13 (3)**.

GUSTAVINO, B.; CERETTI, E.; ZANI, C.; ZERBINI, I.; RIZZONI, M.; MONARCA, S.; FERETTI, D. 2012. Influence of Temperature on Mutagenicity in Plants Exposed to Surface Disinfected Drinking Water. **Journal of Water Resource and Protection**, **4**: 638-647.

HAIDER, S.; NAITHANI, V.; BARTHWAL, J.; KAKKAR, P. 2004. Heavy metal content in some therapeutically important medicinal plants. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, **72**: 119–127.

HANSON, C.H.; PEDERSEN, M.W.; BERRANG, B.; WALL, M.E.; DAVIS JÚNIOR, K.H. 1973. The saponin in alfalfa cultivars. **Crop Science Society of America**, 33-52.

HARIDAS, V.; HIGUCHI, M.; JAYATILAKE, G.S.; BAILEY, D.; MUJOO, K.; BLAKE, M.E. 2001. Avicins: Triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Bentham) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **98**: 5821–5826.

HORVÁTHOVA, E.; SLAMENOVÁ, D.; HLINCIKOVA, L.; MANDAL, T.K. GÁBELOVÁ, A.; COLLINS, A.R. 1998. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. **Mutation Research**, **409**: 163-171.

HOUK, V.S. 1992. The genotoxicity of industrial wastes and effluents – a review. **Mutation Research**, **277**: 91-138.

HUANG, H.C.; LIAO, S.C.; CHANG, F.R.; KUO, Y.H.; WU, Y.-C. 2003. Molluscicidal saponins from *Sapindus mukorossi*, inhibitory agents of golden apple snails, *Pomacea canaliculata*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **51**: 4916-4919.

HUSSAIN, M.S.; FAREED, S.; ANSARI, S.; RAHMAN, M.A.; AHMAD, I.Z.; SAEED, M. 2012. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. **Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences**, **4 (1)**: 10-20.

ILBAS, A.I.; GONEN, U.; YILMAZ, S.; DADANDI, M.Y. 2012. Cytotoxicity of *Aloe vera* gel extracts on *Allium cepa* root tip cells. **Turkish Journal of Botany**, **36**: 263-268.

IWALOKUN, B.A.; OYENUGA, A.O.; SAIBU, G.M.; AYORINDE, J. 2011. Analyses of Cytotoxic and Genotoxic Potentials of *Loranthus micranthus* using the *Allium cepa* Test. **Current Research Journal of Biological Sciences**, **3(5)**: 459-467.

JADHAV, V.V.; JADHAV, A.S.; CHADAGADE, C.A.; RAUT, P.D. 2012. Genotoxicity of Bisphenol A on Root Meristem Cells of *Allium cepa*: a Cytogenetic Approach. **Asian Journal of Water, Environment and Pollution**, **9 (1)**: 39-43.

JÚNIOR, H.B.P.; BORGES, L.M.F.; SOUSA, L.A.D.S.; CUNHA, L.C.; JÚNIOR, R.S.L.; MELO, D.F.A.; PEREIRA, M.E. 2012. avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em camundongos . **Ciência Animal Brasileira**, **13 (4)**: 512-519.

KAMRA, D.N. 2005. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, **89 (1)**: 124-134.

KATIYAR, C.; GUPTA, A.; KANJILAL, S.; KATIYAR, S. 2012. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. **AYU: An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda**, **33 (1)**: 10-19.

KIM, J.H. 2012. Cardiovascular Diseases and *Panax ginseng*: A Review on Molecular Mechanisms and Medical Applications. **Journal of Ginseng Research**, **36 (1)**: 16-26.

KLEIN, R. 2004. Phytoecdysteroids. **Journal of the American Herbalist Guild**, **7**: 10-20.

KORATKAR, R.; RAO, A.V. 1997. Effect of soya bean saponins on azoxymethane-induced preneoplastic lesions in the colon of mice. **Nutrition and Cancer**, **27**: 206–209.

KURAS, M.; PILARSKI, R.; NOWASKOWSKA, J.; ZOBEL, A.; BRZOST, K.; ANTOSIEWICZ, J.; GULEWICZ, K. 2009. Effect of Alkaloid-Free and Alkaloid-Rich preparations from *Uncaria tomentosa* bark on mitotic activity and chromosome morphology evaluated by *Allium* Test. **Journal of Ethnopharmacology**, **12**: 140-147.

KURIYAMA, R., 1982. Effect of colcemid on the centriole cycle in Chinese hamster ovary cells. **Journal of Cell Science**, **53**: 155–171.

KUZINA, V.; EKSTRØM, C.T.; ANDERSEN, S.B.; NIELSEN, J.K.; OLSEN, C.E.; BAK, S. 2009. Identification of defense compounds in *Barbarea vulgaris* against the herbivore *Phyllotreta nemorum* by an ecometabolomic approach. **Plant Physiology**, **151**: 1977–1990.

LAUGHINGHOUSE, H.D.; PRÁ, D.; SILVA-STENICO, M.E.; RIEGER, A.; FRESCURA, V.D.S.; FIORE, M.F.; TEDESCO, S.B. 2012. Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**, **432**: 180–188.

LEE, M.W.; KIM, S.U.; HAHN, D.R. 2001. Antifungal activity of modified hederagenin glycosides from the leaves of *Kalopanax pictum* var. *chinese*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, **24**: 718–719.

LEE, M.H.; SEO, J. W.; SHIN, C. G.; KIM, J. G.; YI, J. S.; YANG, D. C.; CHOI, Y. C. 2004. Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene. **Plant and Cell Physiology**, **48 (8)**: 976-984.

LEISHANGTHEM, S.; THOUNAOJAM, B. 2011. Evaluation of genotoxic effects of aqueous extract of *Croton caudatus* Geiseler leaves on mice. **Caryologia**, **64 (4)**: 365-369.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M. A. 2008. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - A case study. **Mutation Research: Genetic and Toxicology Environmental Mutagenesis**, **650**: 80-86.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, **682**: 71–81.

LEMESHKO, V.V.; HARIDAS, V.; QUIJANO, P.E.; REZ, J.C.; GUTTERMAN, J.U. 2006. Avicins, natural anticancer saponins, permeabilize mitochondrial membranes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **454**:114–122.

LEVAN, A. 1938. The effect of colchicines in root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, **24**: 471-486.

LI, X.X.; DAVIS, B.; HARIDAS, V. 2005. Proapoptotic triterpene electrophiles (avicins) form channels in membranes: cholesterol dependence. **Biophys Journal**, **88**: 2577–2584.

LIMAN, U.G.G.; AKYIL, D.; EREN, Y.; KONUK, M. 2012. Evaluation of genotoxic and mutagenic effects of aqueous extract from aerial parts of *Linaria genistifolia* subsp. *Genistifolia*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, **22(3)**: 541-548.

LIN, S.B.; LEE, S.S.; KAN, L.S. 2003. Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. **Life Sciences**, **72**: 2381–90.

LIU, W.; GIORGIO, C.D.; LAMIDI, M.; ELIAS, R.; OLLIVIER, E. MÉO, M.P. 2011. Genotoxic and clastogenic activity of saponins extracted from *Nauclea* bark as assessed by the micronucleus and the comet assays in Chinese Hamster Ovary cells. **Journal of Ethnopharmacology**, **137**: 176 -183.

LORENZI, H.; MATTOS, F.J. A. 2002. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas. **Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum**, **2**: 2ª Ed. 576p.

MACAN, J.M.; TEIXEIRA, G.A.; CLAUS, T.P.; PEDROSA, R.C.; FÁVERE, V.T.; GEREMIAS, R. 2012. Avaliação da toxicidade de drenagem ácida de mina de carvão, utilizando parâmetros físico-químicos e bioensaios. **Revista Brasileira de Biociências**, **10 (3)**: 275-280.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C; VEIGA JUNIOR, V. F. 2005. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, **25 (3)**: 429-438.

MAHESHWARI, R.; RANI, B.; YADAV, R.K.; PRASAD, M. 2012. Magan Usage of Holy Basil for Various Aspects. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, **1 (10)**: 67 – 69.

MAHMOOD, A.; MAHMOOD, A.; MAHMOOD, M. 2012. In vitro Biological Activities of Most Common Medicinal Plants of Family Solanaceae. **World Applied Sciences Journal**, **17 (8)**: 1026-1032.

MÁRIA, C.S.; ROSILDA, M.M. 2010. Avaliação do efeito derretente de extratos vegetais sobre *Papilio thoas brasiliensis* (Lepdoptera> Papilionidae) Rothschild e Jordan, 1906. **Journal of The Selva Andina Research Society**, **1 (1)**: 50-56.

MARCANO, L.; DEL-CAMPO, A. 1995. Studio ultrestructural del nucléolo en poblaciones meristemáticas de cebola *Allium cepa* L. tratadas com inhibidores metabólicos. **Ciencia**, **3**: 73–82.

MARCANO, L.; BRACHO, M.; MONTIEL, X.; CARRUYO, I.; ATENCIO, L. 1998. Efecto mitotóxico y genotóxico del cadmio em poblaciones meristemáticas de *Allium cepa* L. (cebola). **Ciencia**, **6**: 93–99.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL-CAMPO, A.; MONTIEL, X. 2004. Cytotoxicity and mode of actino of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa*. **Environmental Research Letters**, **94**: 221–226.

MARCHIORETTO, M.S.; MIOTTO, S.T.S.; SIQUEIRA, J.C. 2010. O gênero *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae) no Brasil. **Hoehnea**, **37(3)**: 461-511.

MARQUES, L. C. 1998. **Avaliação da ação adaptógena das raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen - Amaranthaceae**. Tese de Doutorado em Psicobiologia. Universidade Federal de São Paulo. 145p.

MARQUES, L.C.; DANUCALOV, M.A.; TORRES, F.; GALDUROZ, J.C.; CARLINI, E.L.A.; SILVA, A.C. 2002. Estudo clínico duplo-cego de extrato padronizado (BNT-08) das raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen: avaliação do efeito tônico em atividade física. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **12**: 44-47.

MARQUES, L.C.; GALVÃO, S.M.P.; ESPINOLA, E.; DIAS, R.F.; MATTEI, R.; OLIVEIRA, M.G.M.; CARLINI, E.L.A. 2004. Psychopharmacological assesment of *Pfaffia glomerata* roots (extract BNT-08) in rodents. **Phytotherapy Research**, **18**: 566-572.

MASOOD, F.; MALIK, A. 2013. Cytotoxic and genotoxic potential of tannery waste contaminated soils. **Science of The Total Environment**, **444 (1)**: 153-160.

MDIC – Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. 2012. Disponível em: <http://aliceweb.mdic.gov.br//consulta-ncm/consultar>. Raízes de "ginseng", frescas, secas, incl.cortad.tritur.pó. acesso em: 10/05/2012.

MENDES, F.R.; CARLINI, E.A. 2007. Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, **109**: 493–500.

MENDES, F.R. 2011. Tonic, fortifier and aphrodisiac: adaptogens in the Brazilian folk medicine. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, **21 (4)**: 754-763.

MENDES, S.S.; ANDRADE, J.A.; XAVIER, M.A.; JÚNIOR, J.A.S.; PANTALEÃO, S.M.; ESTEVAM, C.S.; GARCIA, C.A.B.; FERRARI, S.F. 2012. Genotoxicity test of *Maytenus rigida* and *Aristolochia birostris* in the radicular meristem of the onion, *Allium cepa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, **21(4)**: 76-81.

MENEGUETTI, D.U.O.; SILVA, F.C.; PELLEZZI, D.C.; SOUZA, N.C.; RAMOS, L.J. 2011. Adaptation of the technical micronucleus in *Allium cepa* to future analysis of mutagenicity of the rivers of the Vale do Jamari, Rondônia, Brazil. **X Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA)**. São Pedro – SP.

MENEGUETTI, D.U.O.; SILVA, F.C.; ZAN, R.A.; RAMOS, L.J. 2012 Adaptation of the Micronucleus Technique in *Allium Cepa*, For Mutagenicity Analysis of the Jamari River Valley, Western Amazon, Brazil. **Journal of Environmental and Analytical Toxicology**, **2**:127-130.

MESQUITA, M.M. 2010. **Potencial antitumoral de substâncias isoladas de plantas do Cerrado brasileiro: estudos preliminares do mecanismo de ação da atividade citotóxica**. Tese de Doutorado em Ciências Médicas, FMD. 167p.

METIN, M.; BURUN, B. 2010. Effects of the High Doses of *Urginea maritima* (L.) Baker Extract on Chromosomes. **Caryologia**, **63 (4)**: 367-375.

MIERLICI, I.D.; GHIORGHITA, G.; CAPRARU, G. 2009. Some cytogenetic effects induced in barley by the treatments with hydroalcoholic rosemary extract. **Analele Stiintifice ale Universitatii Ovidius Constanta**, **5**: 11-15.

MIHALESCU, L.; ROSCA, O.M.; VOSGAN, Z.; DUMUTA, A.; CORDEA, M.; MAXIM, A. 2012. Influence of Lead and Cadmium on Some Physiologic Indices of *Allium cepa*. **Bulletin UASVM Agriculture**, **69 (1)**: 195-200.

MING, L.C.; CORRÊA-JÚNIOR, C. 2002. Collection of Fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] in North western State of Paraná – Brazil. **Acta Horticulturae**, **576**: 29-32.

MONTANARI JUNIOR, I.; MAGALHÃES, P.M.; QUEIROGA, C.L. 1999. Influence of plantation density and cultivation cycle on root productivity and tenors of β -ecdysone in *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Acta Horticulturae**, **3 (502)**: 125-128.

MONTEIRO, A.G.C.C.; TOMAZELLI, C.; TIBES, K.S.; SABADINI, M.B.; RIBEIRO, A.F. 2012. *Pfaffia paniculata*: relato de experiência sobre o ensino de fitoterapia na graduação em enfermagem. **Revista de enfermagem**, **8(8)**: 256-264.

MORAES, L. G.; ALONSO, A. M.; FILHO, E. C. O. 2011. Plantas medicinais no tratamento do câncer: uma breve revisão de literatura. Universitas. **Ciências da Saúde. Brasília**, **9 (1)**: 77-99.

MORRISSEY, J.P.; OSBOURN, A.E. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology**, **63**: 708–724.

MOURA, C.L.; CASEMIRO, L.A.; MARTINS, C.H.G.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.; CURY, A.H.V. 2011. Evaluation of the antimicrobial activity of the plant species *Pfaffia glomerata* against oral pathogens. **Investigação**, **11 (2)**: 24-28.

MUJOO, K.; HARIDAS, V.; HOFFMANN, J.J.; WACHTER, G.A.; HUTTER, L.K.; LU, Y. 2001. Triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) decrease tumor cell proliferation and induce apoptosis. **Cancer Research**, **61**: 5486–90.

MUNHOZ, B.J.P.; LEFFA, D.D.; MAZZORANA, D.; PAGANINI, A.D.; ROSSATO, A.M.; ANDRADE, V.M. 2012. Avaliação do potencial antígeno tóxico do suco de Aloe vera (*Aloe Barbadosensis*, Miller) em camundongos. **Revista Inova Saúde, Criciúma**, **1**: 130-145.

NAKAI, S.; TAKAGI, N.; MILICHI, H.; HAYASHI, S.; NISHIMOTO, N.; TAKEMOTO, T.; KIZU, H. 1984. Pfaffosides, Nortriterpenoid Saponins, from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, **23 (8)**: 1703-1705.

NETO, A. G. 2003. **Obtenção e screening contra dor, inflamação, doença de chagas e leishmaniose do extrato hidraalcoólico bruto raízes de *Pfaffia glomerata***. Dissertação de Mestrado. Promoção de Saúde. Universidade de Franca. 91p.

NIELSEN, J.K.; NAGAO, T.; OKABE, H.; SHINODA, T. 2010. Resistance in the plant *Barbarea vulgaris* and counter-adaptions in flea beetles mediated by saponins. **Journal of Chemical Ecology**, **36**: 277–285.

NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAGAGI, N.; HAYASHI, S.; TAKEMOTO, T.; ODASHIMAS, M. S.; KIZU, H.; WADA, Y. 1984. Pfaffosides and nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, **23 (1)**: 139-142.

NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; FUGINO, M.; INOUE, S. TAKEMOTO, T.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G, TANAKA, O.; KASAI, H.; MATSUURA, H. 1987. Ecdsteroids from *Pfaffia iresinoids* and reassignment of some ¹³C NMR chemical shifts. **Phytochemistry**, **26**: 1505-2507.

NISHIMOTO, N. 1988. Three Ecdysteroid Glycosides from *Pfaffia*. **Phytochemistry**, **27 (6)**: 1665- 1668.

NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; INOVE, S.; TAKEMOTO, T.; AKISUE, G.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, M.K.; HASIMOTO, G. 1990. Ecdisteroides de *Pfaffia glomerata*. **Simpósio de plantas medicinais do Brasil**, 11p.

NOLDIN, V. F.; MONACHE, F. D.; YUES, R. A. 2003. Composição química e atividade biológica de *Cynara scolymus* L. cultivada no Brasil. **Química Nova**, **26(3)**: 331-334.

OLIVEIRA, F.G. 1980. Contribution to the Pharmacognostic Study of Brazilian Ginseng *Pfaffia paniculata*, **Anais de Farmácia e Química de São Paulo**, **20 (1-2)**: 277-361.

OLIVEIRA, L. M.; VOLTOLI NI, J. C.; BARBÉRIO, A. 2011. Potencial mutagênico dos poluentes na água do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste *Allium cepa*. **Ambi-Água**, **6 (1)**: 90-103,

OLIVEIRA, J.P.W.; SANTOS, R.N.; CRISTIANE, C.P.; JANE, M.B.; 2012a. Genotoxicity and Physical Chemistry Analysis of waters from Sinos River (RS) using *Allium cepa* and *Eichhornia crassipes* as bioindicators. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, **1(1)**: 15-22.

OLIVEIRA, W.C. 2012b. **Reação de genótipos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen a *Meloidogyne javanica* e estudo morfo-anatômico da espécie hospedeira**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília. 95p.

OLIVEIRA, V.B.; YAMADA, L.T.; FAGG, C.W.; BRANDÃO, M.G.L. 2012c. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, **48**: 170 – 179.

ONYEMAOBI, O. I.; WILLIAMS, G. O.; ADEKOYA, K. O. 2012. Cytogenetic effects of two food preservatives, sodium metabisulphite and sodium benzoate. **Ife Journal of Science**, **14(1)**: 155-165.

OTOFUJI, G.M. 2005. **Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito gastroprotetor das raízes da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**. Dissertação de Mestrado em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 177p.

PACHECO, A.C.; CUSTÓDIO, C.C.; CATISTI, R.A.; PIMENTA, R.B. 2012a. Germinação de sementes de fáfia: influência da época de colheita, condicionamento térmico e armazenamento. **Colloquium Agrariae**, **8 (1)**: 01-09.

PACHECO, A.C.; TRITAN, C.S.; MARQUES, P.A.A.; DILVA, A.F. 2012b. Efeito da aplicação de fosfato natural em plantas de fáfia cultivadas a campo. **Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia**, **5(1)**: 175-186.

PARRA A.V; LÓPEZ A.G; RUIZ, A.R, FERRER, J.P; MARTINEZ, R.R. 2000. Derivados antraquinônicos del *Aloe vera* I. tamizaj e genotóxico. **Revista Cubana de Plantas Medicinai**; **5(2)**: 46-50.

PATIL, S.J.; PATEL, B.R.; CHAUDHARI, R.K. 2011. Efficacy of synthetic and botanical insecticides against aphid, *Aphis gossypii* Glover in isabgol crop. **Pestology**, **35**: 32-34.

PAWAR, V.S.; HUGAR, S. 2012. Adaptogenic activity of *Trigonella foenum graecum* (Linn) seeds in rodents exposed to anoxia and immobilization stress. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, S208-S211.

PAWLOWSKI, A.; KALTCHUK-SANTOS, E.; ZINI, C.A.; CARAMÃO, E.B.; SOARES, G.L.G. 2012. Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. **South African Journal of Botany**, **80**: 96–103.

PETROVSKA, B.B. 2012. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Review**, **6 (11)**: 1-5.

PING, K.Y.; DARAH, I.; YUSUF, U.K.; YENG, C.; SASIDHARAN, S. 2012. Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: An *Allium cepa* Assay. **Molecules**, **17**: 7782-7791.

PIRES, N.M.; SOUZA, I.R.P.; PRATES, H.T.; FARIA, T.C.L.; FILHO, I.A.P.; MAGALHÃES, P.C. 2001. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **13 (1)**: 55-65.

POLETTO, P.C.; BERNARDON, B.; ZAN, R.A.; RAMOS, L.J.; MENEGUETTI, D.U.O. 2011. Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris rariflora* (Fabaceae), timbó amazônico, através do teste micronúcleo em *Allium cepa*. **Revista Pesquisa e Criação**, **10 (1)**: 163-175.

QIN, R.; JIANG, W.; LIU, D. 2013. Aluminum can induce alterations in the cellular localization and expression of three major nucleolar proteins in root tip cells of *Allium cepa* var. *Agrogarum* L. **Chemosphere**, **90 (2)**: 827-34.

RAM, S. 2010. Research practices in herbal medicinal plant: a case study of podophyllotoxin. **Annals of Library and Information Studies**, **57**: 65-71.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. 1993. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, **418**: 113–119.

RATES, S. M. K.; GOSMANN, G. 2002. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **12(2)**: 85-93.

RAY, S.; KUNDU, L.M.; GOSWANI, S.; ROY, G.C.; CHATTERJEE, S.; DUTTA, S.; CHAUDHURI, A.; CHAKRABARTI, C.S. 2013. Metaphase arrest and delay in cell cycle kinetics of root apical meristems and mouse bone marrow cells treated with leaf aqueous extract of *Clerodendrum viscosum* Vent. **Cell Proliferation**, **46 (1)**: 100-117.

REN, F.; GAO, Y.; CHENG, X.; LI, L.; CHEN, H.; CHEN, S.; ZHANG, Y. 2012. Study on Chemical Constituents of *Zornia diphylla*. **Chinese Pharmaceutical Journal**, **10(3)**: 140-145.

RIBEIRO, P. G. F.; PEREIRA, E. F. 1994. Estudo da germinação das sementes de *Pfaffia glomerata*. **Anais do Simpósio de plantas medicinais do Brasil**, 206p.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. 2003. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. Mutagênese Ambiental. Canoas. **Editores da Universidade Luterana do Brasil**, 21-27.

SÁ BARRETO, L. C. L.; XAVIER, H. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAZ-FILHO, R. 2005. Ecdisteróide e iridóide glicosilado de *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **15(1)**: 51-54.

SAHA, S.; WALIA, S.; UMAR, J.; PARMAR, B.S. 2010. Structure–biological activity relationships in triterpenic saponins: the relative activity of protobassic acid and its derivatives against plant pathogenic fungi. **Pest Management Science**, **66**: 825 - 831.

SAMUELSSON, G. 2004. Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy. **5th Swedish Pharmaceutical Press**.

SANCHES, N.R.; GALLETTO, R.; OLIVEIRA, C.E.; BAZOTTE, R.B.; CORTEZ, D.A.G. 2001. Avaliação da atividade anti-hiperglicemiante de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Acta Scientiarum**, **23 (2)**: 613-617.

SANDERMANN, W.; FUNKE, H. 1970. Termiten resistenz alter Tempelhölzer aus dem *Mayagebiet durch* Saponine [resistance of old temple wood from the maya territory towards termites due to saponins]. **Naturwissenschaften**, **57**: 407–414.

SCOLNICK, D.M.; HALAZONETIS, T. 2000. Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. **Nature**, **406**: 430-435.

SEENIVASAN, N., 2011. Bioefficacy of antinemic plants against root-knot nematode in medicinal coleus. **Journal of Ecofriendly Agriculture**, **6**: 92-96.

SERRA, L.Z.; FELIPE, D.F.; CORTEZ, D.A.G. 2012. Quantification of β -ecdysone in different parts of *Pfaffia glomerata* by HPLC. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, **22(6)**: 1349-1354.

SHAMINA, N.V.; SILKOVA, O.G.; SERIUKOVA, E.G. 2003. Monopolar spindles in meiosis of intergeneric cereal hybrids. **Cell Biology International**, **27**: 657–664.

SHARMA, J.R.; AMRATE, P.K.; GILL, B.S. 2010. Leaf soft disease of *Aloe barbadensis* and its management. **Journal of Research - Punjab Agricultural University**, **47**: 22-24.

SHARMA, A.; PURKAIT. 2013. Quality assessment of serially ultradiluted and agitated drug *Digitalis purpurea* by emission spectroscopy and clinical analysis of its effect on the heart rate of Indian *Bufo melanosticus*. **Journal of Pharmaceutics**, 1-6.

SHINODA, T.; NAGAO, T.; NAKAYAMA, M.; SERIZAWA, H.; KOSHIOKA, M.; OKABE, H.; KAWAI, A. 2002. Identification of a triterpenoid saponin from a crucifer, *Barbarea vulgaris*, as a feeding deterrent to the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Journal of Chemical Ecology**, **28**: 587–599.

SHIOBARA, Y; INOUE, S.; NISHIGUCHI, Y.; KATO, K.; TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, N.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G. 1993. Iresinoide, a yellow pigment from *Pfaffia iresinoides*. **Phytochemistry**, **31(3)**: 953-956.

SIDDIQUI, M.J.A.; ISMAIL, Z.; SAIDAN, N.H. 2011. Simultaneous determination of secondary metabolites from *Vinca rosea* plant extractives by reverse phase High Performance Liquid Chromatography. **Pharmacognosy Magazine**, **7(26): 92-96**.

SILVA, T.C. 2008. **Efeitos anti-neoplásicos da raiz de *Pfaffia paniculata* (ginseng brasileiro) no modelo de hepatocarcinogênese murina e em cultura de células de hepatocarcinoma humano**. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. 178f.

SILVA, A. C.; NEPOMUCENO, J. C. 2010. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. Perquirere, Patos de Minas. Centro Universitário de Patos de Minas. **UNIPAM,7 (1): 167-179**.

SILVA, V.S.; PAWLOWSKI, A.; SANTOS, E.K.; ZINI, C.A.; SOARES, G.L.G. 2011a. Cytotoxicity of essential oils from two species of *Heterothalamus* (Asteraceae). **Australian Journal of Botany**, **59(7): 682-691**.

SILVA, F.C.; BARROS, M.A.B.; VIANA, R.R.; ROMÃO, N.F.; OLIVEIRA, M.S.; MENEGUETTI, D.U.O. 2011b. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste de micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, **2(1):13 -22**.

SILVA, M.R.B; GUEDES, K.B. 2012a. **Biomassa, morfologia e curva de crescimento de cinco genótipos de *Pfaffia glomerata* em condição de estufa**. Monografia de conclusão de curso. Universidade de Brasília. 28p.

SILVA, N.S.; SILVA, H.S.; ANDRADE, E.M.G.; SOUZA, J.R.; FURTADO, J.R.S. 2012b. Fatores antinutricionais em plantas forrageiras. **Revista Verde**, **7(4): 01-07**.

SILVA, V.S. 2012c. **Potencial alelopático do óleo essencial de espécies de *Heterothalamus Less* (Asteraceae) nativas do Rio Grande do Sul**. Tese de Doutorado. 67p.

SINGH, R.J., 2003. Plant Cytogenetics. **CRC Press, Boca Raton, F.L**

SIQUEIRA, J. C.; GRANDI, T.S.M. 1986. O gênero *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae) nos cerrados e campos rupestres de Minas Gerais. **Acta Biológica Leopoldensia**, **8 (2)**: 213-230.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M. J. 1996. The Evaluation of Waste, Surface and Ground Water Quality Using *Allium* Test Procedure. **Mutation Research, Amsterdam**, **368 (3-4)**: 171-179.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. 1972. Amaranthaceae de Santa Catarina. Flora Illustrada Catarinense. Itajaí. **Herbário Barbosa Rodrigues**, 35-50.

SOUSA, S.M.; SILVA, P.S.; CAMPOS, J.M.S.; VICCINI, L.F. 2009. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. **Caryologia**, **62: (4)**: 326-333,

SOUZA FILHO, A.P.; RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D. 1997. Efeitos do potencial alelopático de três leguminosas forrageiras sobre três invasoras de pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **32**: 165-170.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. 2005. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 291p.

SPEROTTO, A.R.M. 2012. **Efeito do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth e do seu component majoritário nerodilol sobre a estabilidade genômica de *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação de Mestrado. Pós graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 126p.

STRANSKA, I.; SKALICKY, M.; NOVAK, J.; MATYASOVA, E.; HEJNAK, V. 2013. Analysis of selected poppy (*Papaver somniferum* L.) cultivars: Pharmaceutically important alkaloids. **Industrial Crops and Products**, **41**: 120–126.

SUMARA, I.; GIMENEZ-ABIA, N.J.F.; GERLICH, D.; HIROTA, T.; KRAFT, C.; LA TORRES, T. 2004. Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles. **Current Biology**, **14**: 1712–1722.

SUNG, W.S.; LEE, D.G., 2008a. *In vitro* candidacidal action of Korean red ginseng saponins against *Candida albicans*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, **31**: 139–142.

SUNG, W.S., LEE, D.G., 2008b. The combination effect of Korean red ginseng saponins with Kanamycin and Cefotaxime against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, **31**: 1614–1617.

TANAKA, N.; YAMASHITA, K.; TAKAO, M.; MATSUMOTO, T.1995. Clonal propagation of 20-hydroxyecdysone producing plant, *Pfaffia iresinoides*. **Plant Tissue Culture Letters**, **12 (2)**: 187-191.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2004. Fisiologia vegetal. 3.ed. Porto Alegre. **Artmed**, 719 p.

TEERARAK, M.; BHINIJA, K.; THITAVASANTA, S.; LAOSINWATTANA, C. 2009. The impact of sodium chloride on root growth, cell division, and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in root tip of *Allium cepa* L. **Scientia Horticulturae**, **121**: 228-232.

TEERARAK, M.; LAOSINWATTANA, C.; CHAROENYING, P. 2010. Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. grandiflorum (L.) Kob. on bioassay plants. **Bioresource Technology**, **101**: 5677–5684.

TEERARAK, M.; CHAROENYING, P.; LAOSINWATTANA, C. 2012. physiological and cellular mechanisms of natural herbicide resource from *Aglaia odorata* Lour. on bioassay plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, **34 (4)**: 1277-1285.

TEDESCO, S.B.; LAUGHINGHOUSE IV, H.D. 2012. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test, Environmental Contamination, Dr. Jatin Srivastava (Ed.) In ISBN: 978-953-51-0120-8, InTech, **InTech**, DOI: 10.5772/31371. Available from: <http://www.intechopen.com/books/environmental-contamination/bioindicator-of-genotoxicity-the-allium-cepa-test>.

TEIXEIRA, K. 2011. **Plantas medicinais que podem causar alteração na pressão arterial e interação com anti-hipertensivos** .Monografia apresentada para obtenção de Título de Bacharel em Farmácia. Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), 28p.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. 2001. Herbarium compêdio de fitoterapia. **Herbarium Laboratório Botânico**, 4:130-131.

THENMOZHI, A.; RAO, M. 2012. Secondary Metabolite screening, Bioactive compound extraction, and Disrupting Mitotic Activity of Wild Cabbage [Brassicaceae] towards Cancer Management. **Asian Journal of Pharmaceutical Research**, **2 (1)**: 19-31.

TOLEDO, M. R. S.; SILVA, C. C.; ANTONELLO, D.; PIMENTA, K. R.; VIEIRA, M. C.; RAMOS, M. B. M.; NESTOR, A.; HEREDIA, Z. 2002. Extratos Aquosos de *Pfaffia glomerata* Spreng e Seu Efeito Tóxico em Ratas Prenhez. Resumo UFSM.

VIGO, C.L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C.; 2003. Validação metodológica de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen - Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **13**: 46-49.

VIGO, C. L. S.; 2004. Caracterização farmacognóstica de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius – Amaranthaceae Kuntz. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, **6 (2)**: 7-19.

VILLELA, V. I.; LAU, A. 2003. Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. Toxicológica. **Porto Alegre: Alcance**, 158-159.

VOGEL, E. W. 1982. Assessment of chemically induced genotoxic events. Prospectives and limitations. Leiden: **The Netherlands University Press**, 2-24.

WAGNER, H.; NORR, H.; WINTERHOFF, H. 1994. Plant adaptogens. **Phytomedicine**, **1**: 63-76.

WAKABAYASHI, C.; MURAKAMI, K.; HASEGAWA, H.; MURATA, J.; SAIKI, I. 1998. An intestinal bacterial metabolite of ginseng protopanaxadiol saponins has the ability to induce apoptosis in tumor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **246**: 725–30.

WALLER, G.R.; JURZYSTA, M.; THORNE, R.L.Z. 1993. Allelopathic activity of root saponins from alfalfa (*Medicago sativa*L.) on weeds and wheat. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, **34**: 1–11.

WANG, W. 1987. Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants. **Environmental Toxicology and Chemistry**, **6**: 409–414.

WATANABE, T.; WATANABE, M.; WATANABE, Y.; HOTTA, C. 2000. Effects of oral administration of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on incidence of spontaneous leukemia in AKR/J mice. **Cancer Detection and Prevention**, **24**:173–8.

XAVIER, B.O.; PASSOS, L.; OLIVEIRA, R.C.; MIELLI, A.C. 2011. Avaliação do Efeito Genotóxico de Diferentes Tipos de Solos para Biomonitoramento com *Tradescantia pallida*. *Genética na Escola*.

YAMADA, C.S.B. 1998. Fitoterapia: sua história e importância. **Racine**, 50-51.

YILDIZ, M.; CIGERCI, I.H.; KONUK, M.; FIDAN, A.F.; TERZI, H. 2009. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, **75**: 934-938.

ZIMMER, A R. 2006. HPLC Method for determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, **40**: 450-453.